

최 종
연구보고서

안전 축산물 확보를 위한
Campylobacter 신속 검출 kit 개발

연구기관
한국소비자보호원
서울대학교
(주) RNL 생명과학

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “안전 축산물 확보를 위한 *Campylobacter* 신속 검출 kit 개발” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 일

주관연구기관명 : 한국소비자보호원

총괄연구책임자 : 서 정 희

협동연구기관명 : 서 울 대 학 교

협동연구책임자 : 박 용 호

협동연구기관명 : 알앤엘 생명과학

협동연구책임자 : 라 정 찬

요 약 문

I. 제 목

안전 축산물 확보를 위한 *Campylobacter* 신속 검출 kit 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

*C. jejuni*와 *C. coli*는 사람에서 장염을 일으키는 중요 원인균이며, 주요 식중독의 원인이기도 하다. 미국에서는 매년 200만에서 800만의 campylobacter 감염증이 발생을 하며, 이 중에서 200에서 800명이 사망하는 것으로 보고되고 있다.

*C. jejuni/coli*는 미호기성이며 그람음성간균이다. *C. jejuni/coli* 감염은 급성 발열, 복통, 혈변등의 증상을 나타내며 Guillain-Barre syndrome의 원인이 되기도 한다. *C. jejuni/coli*가 대부분의 조류와 일부 포유류의 정상 장내세균총이기 때문에 사람에게 감염되는 경로는 다양하다. 사람에서의 campylobacter 감염증대량 발병은 주로 덜익힌 조류식품의 섭취가 원인이다. 미국에서의 조사에 따르면 산발적인 감염의 48-70%는 *Campylobacter*에 오염된 닭고기가 원인이 되는 것으로 나타났다. 그 외 다른 원인으로서는 멸균되지 않은 우유나 정수처리하지 않은 물이 있다. 하지만 *Campylobacter*균의 특징이 영양분 부족이나 물리적인 스트레스로 인해 VNC (viable but nonculturable) 상태로 있을 수 있어 식중독 사고의 여러 원인 검체를 수거하여 배양을 하여도 일반 배양방법으로는 이러한 *Campylobacter*균을 분리하기 어려울 뿐만 아니라 어느 정도의 균이 오염되어 있는지도 파악하기 힘들다. 이에 따라 신속하고 간편하며 성능이 우수한 진단시약 개발이 절실히 요구되어 일부 선진국에서는 다양한 종류의 *Campylobacter* 진단 kit가 개발되어 있다.

국내에서는 현재까지 *Campylobacter* 진단시약이 개발되어 있지 않은 상태로 검사에 소요되는 진단시약을 전량 수입해야 하는 실정이며 *Campylobacter*균에 대한 위해도가 *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 등의 병원성 세균에 비해 상대적으로 문제시되지 않는 것으로 평가되고 있다. 이에 본 연구에서는 검출에 어려움이 있는 *Campylobacter*에 대한 신속한 검출 및 분리 동정기법을 확립함으로써 이에 대한 사전

예방조치를 강구할 수 있도록 본 연구를 수행하였다.

특히 본 연구에서는 국내분리 *Campylobacter*에 특이한 고반응성 단클론 항체를 개발하여 사용이 편리하고 검사과정이 간단·신속하며 대량검사에 적합한 ELISA 방법과 면역크로마토그래피 방법의 실용화에 기여하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 병원성 *Campylobacter* 특이 항원 제조 및 특성 분석 연구

가. 축산물 및 식품에 오염된 균주 분리 및 특성 파악

1) 각 종 *Campylobacter* 균 수집

가) 채래시장 및 대형할인매장에서의 판매중인 축산물(계육, 돈육, 우육)에 오염되어 있는 *Campylobacter*균 분리 동정

나) 미생물협회 등의 표준 균주, 국내 병원의 임상 분리 균주 분양 및 동정

다) 생화적 방법 및 PCR 또는 real time PCR로 *Campylobacter* 동정

2) 표준균주와 국내 분리 균주의 특성 비교 분석

가) PFGE를 통한 균주의 특성파악

나) CadF 유전자 존재 PCR 확인

나. 병원성 *Campylobacter* 특이 항원 제조 및 다클론 항체 제조

1) 국내 분리균주 이용 특이 항원 대량 생산

2) 특이 항원 제조 및 분석 연구

3) 국내 분리 균주 이용 특이 항원 특성 확인

4) 항체 규격 설정

5) 다클론 항체 생산 제조

다. 다클론 및 단클론 항체 생산 공정 확립

1) 다클론 항체 생산 공정 확립

2) 단클론 항체 생산 공정 확립

3) 진단 system 설계 및 확립

2. 병원성 *Campylobacter* 단클론항체 생산, 특이성분석 및 설문조사

가. 진단 kit 유효성 평가 system 확립 / 축산물 안전확보를 위한 설문조사

- 1) 진단 kit 유효성 평가 system 확립
- 2) 검량선 제작 및 외국진단 kit의 특이성 및 감도 조사
- 3) 축산물 안전 확보를 위한 진단 kit에 대한 설문조사
 - 가) 대상: 국가기관, 기업, 학교 등 병원성 미생물 검사 담당자들
 - 나) 내용: 본 과제에 대한 홍보 및 *Campylobacter*의 위해성에 대한 인식, 개발되는 kit의 장점 및 외국 제품비교 우수성 등

나. 병원성 *Campylobacter* 특이 단클론 항체 제조 및 특이성 분석 및 평가

- 1) 병원성 *Campylobacter* 단클론 항체의 개발 및 정제
 - 가) 단클론 항체 생성 하이브리도마의 개발
 - 나) 세포 융합 및 항체 생성 융합 세포의 클로닝
 - 다) 단클론 항체의 평가 및 선정
- 2) 다클론 항체의 대량 생산 및 정제
 - 가) *Campylobacter* 특이 염소 항혈청 생산
 - 나) Ammonium sulfate 침전
 - 다) Immunoaffinity chromatography
 - 라) 면역 흡착을 이용한 비특이 항체의 제거

다. Kit 구성시약 제조 및 kit 최적화 기술 개발

- 1) 구성 시약 제조 및 제조 공정 확립
- 2) 진단 kit formulation 및 kit 최적화

3. 병원성 *Campylobacter* 특이적 진단 kit의 제품화 및 유효성 평가

가. 병원성 *Campylobacter* 진단 kit의 유효성 평가

- 1) 표준 균주 및 분리 균주를 이용한 조사
 - 가) 표준 균주 및 분리 균주를 통한 검출 한계 조사
- 2) 인위적으로 접종한 식품을 이용한 유효성 평가
- 3) 외국제품과의 성능비교 평가
 - 가) *Campylobacter*를 인위적으로 접종한 식품을 이용한 유효성 평가
 - 나) 유통식품을 이용한 field test, 장시간 안정성 평가, 민감도 평가 등
 - 다) 국내 개발 제품의 field 유효성 평가 및 현장 적용 시험의 결과 분석

나. 특이적 단클론 항체의 대량 생산 및 생산 공정 개선 연구

- 1) 특이적 단클론 항체의 대량 생산 및 정제
 - 가) 마우스 복수를 이용한 단클론 항체 생산
 - 나) IgG, IgM 항체의 정제

다. 병원성 *Campylobacter* 진단 Kit의 제품화

- 1) Scale-up 연구
- 2) 경제적인 진단 kit 생산공정 (고효율 저원가 공정) 확립
- 3) 시제품 제작

IV. 연구개발 결과 및 활용

1. 연구개발 결과

가. 국내분리균주의 분리 및 특성파악

- 1) 총 330주의 *Campylobacter* 분리동정

구분	생닭	돼지고기	쇠고기	임상균주
<i>Campylobacter jejuni</i>	50종	-	3종	13주
<i>Campylobacter coli</i>	80종	4종	-	-
<i>Campylobacter jejuni & coli</i> 동시검출	90종	-	-	-
분리율 (양성 샘플수 / 총 샘플수)	81.5% (220/270)	1.6 % (4/250)	1.2 % (3/250)	13주

- 2) PCR/Real Time PCR 이용 *Campylobacter* 확인

- 3) PFGE를 이용한 임상균주 및 축산물 분리균주의 비교분석

- 4) CadF gene PCR 검출 및 염기서열 분석

가) *Campylobacter*의 병원성에 관련하는 인자에는 LPS, flagellin, CBF, PEB, CadF, CiaB, SodB등이 있다.

나) CadF(*Campylobacter* adhesion molecule)는 *C. jejuni*와 *C. coli*의 outer membrane

에 고유하게 존재하며 초기감염단계인 adhesion에 필수적인 역할을 담당하므로 본
과제의 target antigen으로 결정하였다.

다) 모든 *C. jejuni/coli* 분리균주에서 400bp의 CadF 특이 밴드를 PCR로 확인하였다.

5) CadF gene 단백질 서열 분석

- 단백질 서열 분석 결과 일부의 아미노산의 변이를 확인하였다. 이에 단클론 항체를
제조할 경우, 이러한 변이 서열은 피하고 conserve 되어있는 서열에 중점을 두어 제조
하였다.

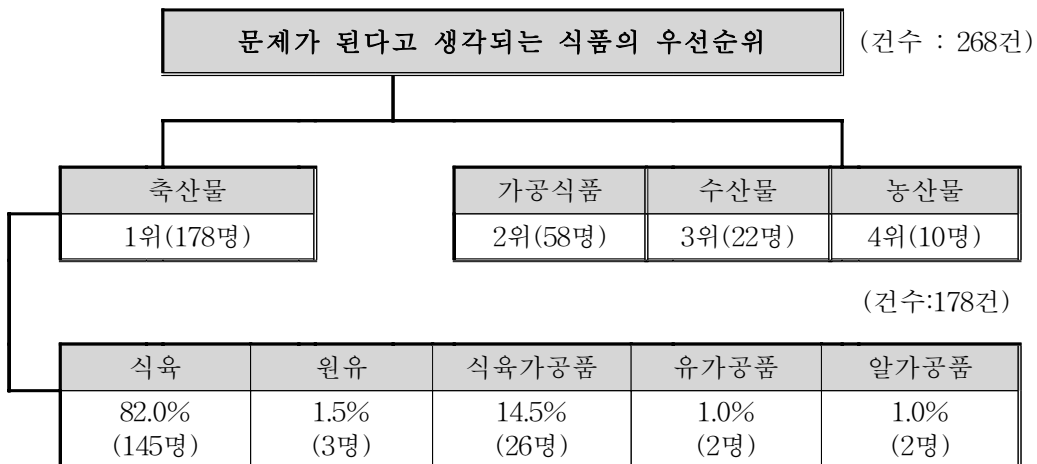
나. 축산물 안전확보를 위한 설문조사/진단 kit 유효성 평가 system 확립

1) 병원성 *Campylobacter*균의 인지 정도 설문조사

(건수 : 268건)

구분	잘 알고 있음	조금 알고 있음	전혀 모름
비율 (건수)	28.0% (75)	63.0% (169)	9.0% (24)

2) 병원성 *Campylobacter*균의 위생문제에 관한 식품 설문조사



3) 국내에서 개발될 병원성 *Campylobacter*균 검출 키트의 사용 의향 설문 조사

(건수 : 264건)

구분	항상 사용할 것임	가끔 사용할 것임	사용하지 않을 것임	기타
비율 (건수)	30.3% (80)	58.3% (154)	6.1% (16)	5.3% (14)

* 설문조사 대상: 관련 학계, 연구기관 및 업계 연구원

다. *Campylobacter* 단클론항체 제작

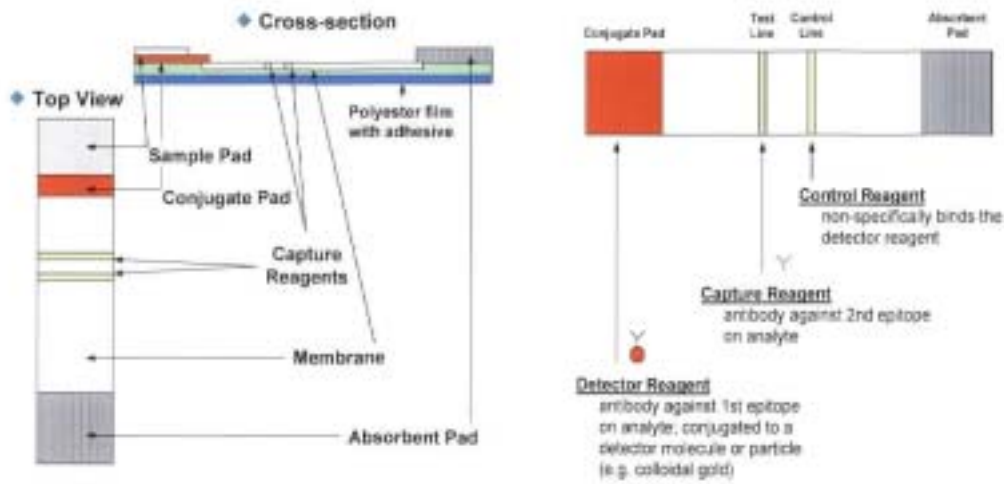
1) 1차클론선발 결과 (ELISA OD)

Clone name	Isotyping	(Whole cell)	(OMP)			
		<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>E.coli</i> O157 H7	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1-1A	-	0.137	0.050	0.057	0.046	0.052
1-1C	IgM	0.476	0.047	0.057	0.045	0.051
1-2A	-	0.106	0.046	0.071	0.049	0.107
1-2G	IgM	0.169	0.055	0.064	0.053	0.060
1-3D	IgG1	0.820	0.069	0.082	0.047	0.050
1-5G	-	0.183	0.053	0.069	0.047	0.048
1-5H	-	0.332	0.051	0.071	0.045	0.059
1-6A	IgM	0.266	0.044	0.067	0.046	0.048
1-6B	-	0.451	0.050	0.060	0.045	0.060
1-7D	IgM	0.194	0.047	0.063	0.044	0.060
1-12F	IgM	0.199	0.047	0.076	0.051	0.055
2-1B	IgG1, IgM	0.654	0.043	0.059	0.047	0.056
2-4A	IgM	0.573	0.043	0.062	0.046	0.067
2-12C	IgG1	0.959	0.050	0.063	0.045	0.052
2-12G	-	0.213	0.047	0.059	0.048	0.056

2) 최종클론선발 결과 (ELISA OD)

Clone name	Peptide	<i>C. jejuni</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>
	Cad F1	Whole cell	Whole cell	Whole cell	Whole cell	Whole cell
3D3	1.840	0.369	0.085	0.071	0.162	0.064
3D30	1.994	0.400	0.085	0.068	0.185	0.067
12C26	1.104	0.381	0.086	0.071	0.151	0.061

라. 진단 Kit의 제조



마. Kit의 효능평가

1) 제품의 특이성 검사

$$\begin{aligned} \text{특이도} &= \frac{\text{음성반응 kit 수 (30)}}{\text{양성반응 kit 수 (0) + 음성반응 kit 수 (30)}} \times 100(\%) \\ &= 100 \% \end{aligned}$$

2) 제품의 민감성 검사

$$\begin{aligned} \text{민감도} &= \frac{\text{양성반응 kit 수 (91)}}{\text{양성반응 kit 수 (91) + 음성반응 kit 수 (9)}} \times 100(\%) \\ &= 91 \% \end{aligned}$$

3) 제품의 재현성 검사

서로 다른 3명(A, B, C)의 시험자가 20개의 진단 kit로 민감성, 특이성 검사를 실시하였으며, 이들의 결과는 모두 동일하게 나왔으므로 재현도는 100%로 판단된다.

4) 제품 반응시간 검사

20개 각각의 반응시간의 합

$$\text{평균반응시간} = \frac{\text{20개 각각의 반응시간의 합}}{20} = 5 \text{ 분}$$

5) 제작 kit과 외국진단 kit의 민감도 비교 조사

구 분		균 농도 (Cell/mL) 에 따른 rapid test 결과							
		10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	0
Singlepath Campylobacter (Merck)	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	++	++	+++	+++	+	-	-	-
	<i>C. coli</i> ATCC 33559	++	++	+++	+++	+	+/-	-	-
	축산물 분리균주 cj1	++	++	+++	+++	+	-	-	-
	임상 분리균주 407	++	++	+++	+++	+	-	-	-
VIP (Biocontrol)	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	++	++	+++	+++	+	-	-	-
	<i>C. coli</i> ATCC 33559	++	++	+++	+++	+	-	-	-
	축산물 분리균주 cj1	++	++	+++	+++	+	+/-	-	-
	임상 분리균주 407	++	+++	+++	+++	+	-	-	-
Rapid Kit (시제품)	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	++	++	+++	+++	+	-	-	-
	<i>C. coli</i> ATCC 33559	++	++	+++	+++	+	+/-	-	-
	축산물 분리균주 cj1	++	++	+++	+++	++	-	-	-
	임상 분리균주 407	++	+++	+++	+++	+	+/-	-	-
비 고		+++ , strong test line; ++, moderate test line; +, weak but distinct test line; +/-, very weak test line; - novisible test line.							

2. 연구결과의 활용

가. 농장에서 식탁까지의 축산물에 대한 *Campylobacter* 오염 현황 파악

- 1) 도축장에서의 도축단계별 오염도 확인
- 2) 가검물의 부위별 오염도 확인
- 3) 시중에 유통중인 축산물에서의 오염도 확인

나. 개발된 진단 kit 이용 신속 질병진단 가능

- 1) 본 kit를 *Campylobacter* 균의 screening 용으로 사용하게 되면, 신속하고 정확하게 판별 가능하여 각 단계별로 중점적으로 오염원 관리를 할 수 있음.
- 2) 오염이 주로 이루어지는 단계를 파악함으로써 HACCP 과정 중 CCP 설정의 참고자료로 활용

다. 면역크로마토그래피법 국내 확립으로 기존의 수입의존 탈피 모색가능

라. 이러한 결과를 바탕으로 식품의 생산, 가공, 유통 및 소비 단계까지의 철저한 검증과 오염정도를 정확하게 알아내어 안전한 식품을 제공하고 축산물 및 식품에 대한 소비자의 신뢰를 쌓게 될 것임.

SUMMARY

I. Project title

Development of *Campylobacter* rapid detection kit for safe livestock security

II. Objectives and necessities of the project

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli* are important human pathogens causing human enterocolitis, and they are the major causes of bacterial food-borne diarrhea in industrialized countries. In the United States, between 2 and 8 million cases of campylobacteriosis result in an estimate 200 to 800 deaths per year.

C. jejuni/coli are microaerophilic, spiral-shaped, Gram-negative bacterium. Infection with *C. jejuni/coli* is characterized by the rapid onset of fever, abdominal cramps, and bloody diarrhea. Infection with *C. jejuni* has been shown to be a frequent antecedent to the development of Guillain-Barre-type polyneuropathy. There are many possible causes of infection with *C. jejuni* and *C. coli*, as they are normal intestinal flora in a wide range of birds and mammals. Large-scale outbreaks of human campylobacteriosis are usually linked to the consumption of undercooked chicken. In the United States, case-control studies have attributed 48 to 70% of the sporadic infections to the consumption of *Campylobacter*-contaminated chickens. Sources of the infection also include unpasteurized milk and untreated water.

But if food poisoning accidents occur, culture and detection of *Campylobacter* may be difficult because of its characteristics can be with VNC (viable but nonculturable) state by nutrition insufficiency and physical stress. According to this, prompt and convenient diagnosis reagent development is urgently required; Some advanced countries has developed many different kinds of *Campylobacter* diagnosis kit.

The risk of *Campylobacter* is evaluated relatively low compared to the risk of

Salmonella, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* in Korea. Moreover, a *Campylobacter* diagnosis reagent has not been developed in Korea, so whole quantity must import for an inspection and a hazard analysis of *Campylobacter*. Therefore, the study has been conducted to establish rapid and easy detection system for *Campylobacter* contamination. To apply for provision of safe for production, processing, transportation and consumption.

To using monoclonal antibody specific to *Campylobacter* spp. will contribute to commercialization of a suitable immunochromatography product.

III. The contents and scope of the project

1. Pathogenic *Campylobacter* specific antigen manufacturing and characteristic analysis study.

A. Isolation and characteristic analysis of *Campylobacter* spp. in animal product and food.

1) Collection of *Campylobacter* spp.

a) Isolation and analysis of *Campylobacter* spp. in animal products (poultry, pork, beef) sales in retail store and large wholesale markets.

b) Standard isolates from microbe associations, human isolates from the domestic hospital were provided and identified.

c) *Campylobacter* detection by biochemical test, PCR, and real time PCR.

2) Characteristic analysis of standard isolates and domestic isolates.

a) Characteristics analysis of isolates by PFGE

b) *CadF* gene confirmation by PCR.

B. Pathogenic *Campylobacter* specific antigen manufacturing and characteristic analysis study

1) Specific antigen mass production using domestic isolates

2) Specific antigen production and analysis

3) Confirmation of specific antigen using domestic isolates

- 4) Antibody standard establishment
 - 5) Polyclonal antibody production
- C. Polyclonal and monoclonal antibody production process establishment.
- 1) Polyclonal antibody production process establishment
 - 2) Monoclonal antibody production process establishment
 - 3) Diagnosis system design and establishment

2. Production and characteristic analysis of pathogenic *Campylobacter* monoclonal antibody and questionnaire

- A. Diagnosis kit effectiveness evaluation system establishment / questionnaire for an animal products safety.
- 1) Diagnosis kit effectiveness evaluation system establishment
 - 2) Measuring definition and surveillance of specificity and sensitivity of foreign diagnostic kits
 - 3) Questionnaire for a animal products safety.
 - a) Objects: Who is charge of pathogenic microbe inspection such as a national organization, a company and a school.
 - b) Contents: Recognition about public information of this project, a hazard of *Campylobacter*, and merits of kit developed and better superiority than foreign products.
- B. Production, characteristic analysis, and evaluation of pathogenic *Campylobacter* monoclonal antibody
- 1) Development and purification of pathogenic *Campylobacter* monoclonal antibodies
 - a) Development of monoclonal antibody production hybridoma
 - b) Cell fusion and cloning of monoclonal antibody production fusion cells
 - c) Evaluation and selection of monoclonal antibodies
 - 2) Mass production and purification of polyclonal antibody
 - a) Production of goat-antiserum specific for *Campylobacter*
 - b) Ammonium sulfate precipitation
 - c) Immunoaffinity chromatography
 - d) Removal of nonspecific antibody using immuno-precipitation
- C. Manufacturing a kit configuration chemical reagent and developing optimization

technology

- 1) Manufacturing configuration chemical reagent and manufacturing process establishment
- 2) Diagnosis kit formulation and kit optimization.

3. Commercialization of pathogenic *Campylobacter* diagnosis kit and effectiveness evaluation.

A. Effectiveness evaluation of pathogenic *Campylobacter* diagnosis kit

- 1) Surveillance using standard isolates and domestic isolates
 - a) Surveillance of detection limit using standard isolates and domestic isolates
- 2) The effectiveness evaluation that used the foods which was inoculated artificially
- 3) Performance comparison evaluation with an abroad product
 - a) The effectiveness evaluation that used with the foods which was inoculated *Campylobacter* artificially
 - b) Field test, long time stability evaluation, and sensitivity evaluation that used with distribution foods
 - c) Results analysis of field effectiveness evaluation of a domestic development product and a field application test.

B. Mass productions of specific monoclonal antibody and manufacturing process improvement study.

1) Mass production and purification of monoclonal antibody

- a) Monoclonal antibody production from mouse ascites
- b) Purification of IgG, IgM antibodies

C. Commercialization of pathogenic *Campylobacter* diagnosis Kit

- a) Scale-up research
- b) Economic diagnosis kit production process (high efficiency, low cost process) establishment.
- c) Prototype manufacture

IV. Results and recommendation for application

1. Results

A. Isolation and characteristics analysis of domestic isolates

1) Isolation of total 330 *Campylobacter* spp.

Division	Poultry	Pork	Beef	Human isolates
<i>Campylobacter jejuni</i>	50	-	3	13
<i>Campylobacter coli</i>	80	4	-	-
<i>Campylobacter jejuni & coli</i>	90	-	-	-
Isolation rates (Positive sample No. /Total sample No.)	81.5% (220/270)	1.6 % (4/250)	1.2 % (3/250)	13

2) Confirmation of *Campylobacter* using PCR/Real Time PCR

3) Comparative analysis of human isolates and animal product isolates using PFGE

4) CadF gene PCR detection and sequence analysis

a) There are several virulence genes associated with *Campylobacter* virulence including LPS, flagellin, CBF, PEB, CadF, CiaB, SodB.

b) CadF (*Campylobacter* adhesion fibronectin) is exist in outermembrane and essential for fibronectin adhesion that is occur in first stage during infection.

c) Detected the only CadF gene in Target of this project to PCR, and a specific band of 400bp was observed to all *Campylobacter jejuni/coli*.

5) CadF gene protein sequence analysis

- Different partial amino acid sequences were detected through protein sequence analysis results. When producing monoclonal antibody, variation in sequences must

be avoided, and instead, an emphasis on conserved sequence placed.

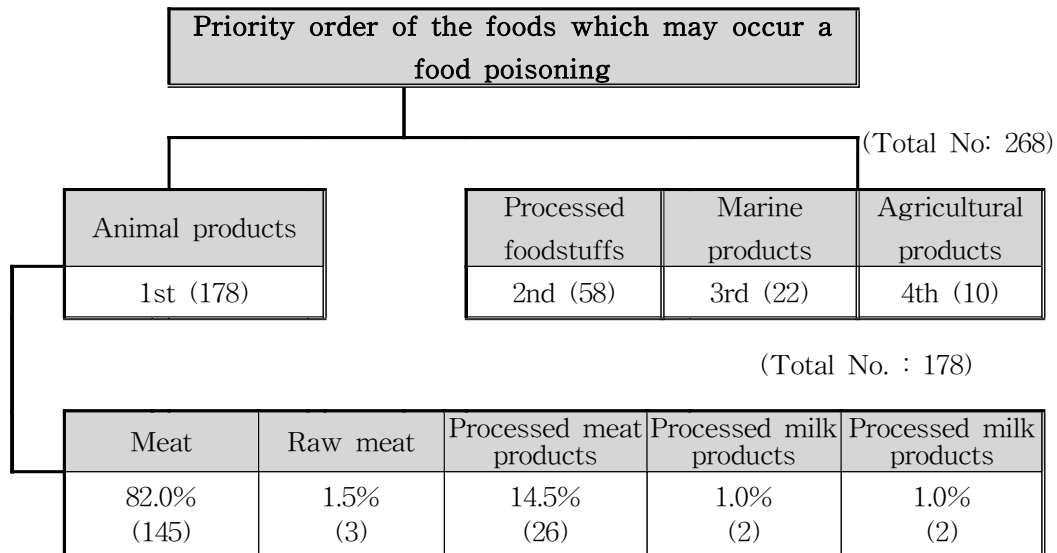
B. Questionnaire for a animal products safety / diagnosis kit effectiveness muss evaluation system establishment.

1) Questionnaire for level of understanding of pathogenic *Campylobacter*

(Total No: 268)

Division	Well known	A little bit known	Ignorance
Rates (No.)	28.0% (75)	63.0% (169)	9.0% (24)

2) Foods questionnaire a sanitary problem works of *Campylobacter*.



3) Questionnaire for usage of pathogenic *Campylobacter* detection kits developed in Korea

(Total No.: 264)

Division	Always using	Sometimes using	Not using	etc.
Rates (No.)	30.3% (80)	58.3% (154)	6.1% (16)	5.3% (14)

* Answers were obtained from: associated universities and research institute researchers

C. *Campylobacter* monoclonal antibody production

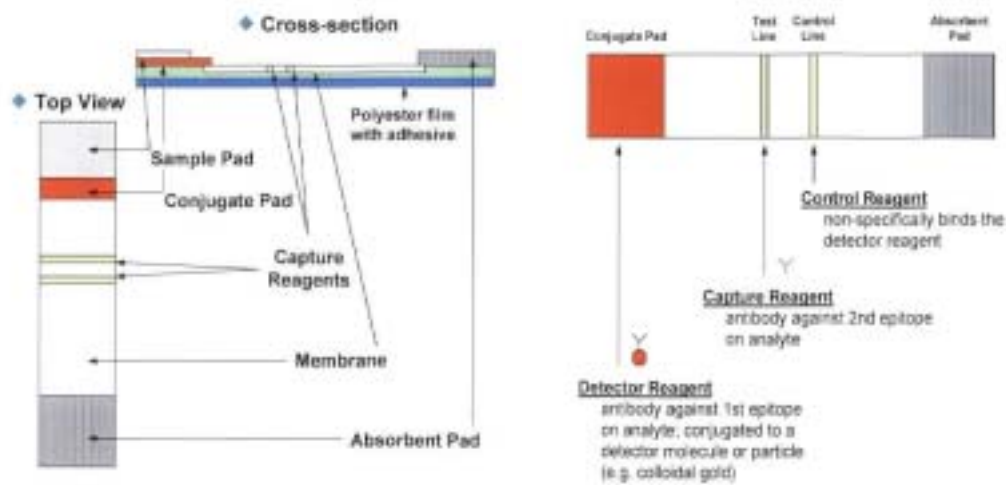
1) Initial clone selection result (ELISA OD)

Clone name	Isotyping	(Whole cell)	(OMP)			
		<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>E.coli</i> O157 H7	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1-1A	-	0.137	0.050	0.057	0.046	0.052
1-1C	IgM	0.476	0.047	0.057	0.045	0.051
1-2A	-	0.106	0.046	0.071	0.049	0.107
1-2G	IgM	0.169	0.055	0.064	0.053	0.060
1-3D	IgG1	0.820	0.069	0.082	0.047	0.050
1-5G	-	0.183	0.053	0.069	0.047	0.048
1-5H	-	0.332	0.051	0.071	0.045	0.059
1-6A	IgM	0.266	0.044	0.067	0.046	0.048
1-6B	-	0.451	0.050	0.060	0.045	0.060
1-7D	IgM	0.194	0.047	0.063	0.044	0.060
1-12F	IgM	0.199	0.047	0.076	0.051	0.055
2-1B	IgG1, IgM	0.654	0.043	0.059	0.047	0.056
2-4A	IgM	0.573	0.043	0.062	0.046	0.067
2-12C	IgG1	0.959	0.050	0.063	0.045	0.052
2-12G	-	0.213	0.047	0.059	0.048	0.056

2) Final clone selection result (ELISA OD)

Clone name	Peptide	<i>C. jejuni</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>
	Cad F1	Whole cell	Whole cell	Whole cell	Whole cell	Whole cell
3D3	1.840	0.369	0.085	0.071	0.162	0.064
3D30	1.994	0.400	0.085	0.068	0.185	0.067
12C26	1.104	0.381	0.086	0.071	0.151	0.061

D. Preparation of diagnostic kit



E. Effectiveness evaluation of diagnostic kit

1) Specificity evaluation

$$\text{Specificity} = \frac{\text{Negative reaction kit No. (30)}}{\text{Positive reaction kit No. (0) + Negative reaction kit No. (30)}} \times 100(\%)$$

$$= 100\%$$

2) Sensitivity evaluation

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{Positive reaction kit No. (91)}}{\text{Positive reaction kit No. (91) + Negative reaction kit No. (9)}} \times 100 (\%)$$

$$= 91 \%$$

3) Reproducibility

Three (A, B, C) different people conducted sensitivity and specificity tests using 20 kits each. Their results has been determined more than 98% reproducibility

4) Reaction time evaluation of diagnostic kit

Sum of each reaction time

$$\text{Mean reaction time} = \frac{\text{Sum of each reaction time}}{20} = 5 \text{ minutes}$$

5) Comparison and application of the developed prototype of diagnostic kit with other commercialized product.

Division		Rapid test results according to bacteria density (Cell/mL)							
		10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	0
Singlepath Campylobacter (Merck)	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	++	++	+++	+++	+	-	-	-
	<i>C. coli</i> ATCC 33559	++	++	+++	+++	+	+/-	-	-
	Animal products isolates cj1	++	++	+++	+++	+	-	-	-
	Human isolates 407	++	++	+++	+++	+	-	-	-
VIP (Biocontrol)	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	++	++	+++	+++	+	-	-	-
	<i>C. coli</i> ATCC 33559	++	++	+++	+++	+	-	-	-
	Animal products isolates cj1	++	++	+++	+++	+	+/-	-	-
	Human isolates 407	++	+++	+++	+++	+	-	-	-
Rapid Kit (prototype)	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	++	++	+++	+++	+	-	-	-
	<i>C. coli</i> ATCC 33559	++	++	+++	+++	+	+/-	-	-
	Animal products isolates cj1	++	++	+++	+++	++	-	-	-
	Human isolates 407	++	+++	+++	+++	+	+/-	-	-
note		+++ , strong test line; ++ , moderate test line; + , weak but distinct test line; +/- , very weak test line; - novisible test line.							

2. Application of results

A. Application of the diagnostic kits for the rapid detection of *Campylobacter* from farm to tables

- 1) Contamination level of slaughter house
- 2) Contamination level of livestock and food at processing steps.
- 3) Contamination level of livestock and food products at market

B. Application of the developed diagnostic kits for HACCP program

- 1) Effective control management system can be established in all HACCP stages to provide safe production
- 2) Develop efficacious methods for define critical control point

C. Protection of domestic technology by substitution of imported diagnostic kits

D. Through these applications, the verification and contamination level of foods can be examined from farm to table for the provision of safe foods. And further consumer creditability for safe food can be obtained.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines of the project	28
Section 1. Necessities of the project	28
Chapter 2. Status and problems in related technology in domestic and overseas	38
Section 1. Status of related domestic technology	38
Section 2. Status of related overseas technology	38
Section 3. Problems of current technology status	40
Chapter 3. Contents of the project and its results	41
Section 1. Surveillance of <i>Campylobacter</i> spp. in animal products	41
Section 2. Questionnaires of using <i>Campylobacter</i> diagnostic rapid kit	68
Section 3. Development of antigen and monoclonal antibodies specific for <i>Campylobacter</i>	76
Section 4. Production of diagnostic kits	105
Section 5. Evaluation of diagnostic kits	114
Chapter 4. Accomplishment and subsequent contributions	128
Section 1. Accomplishment	128

Section 2. Subsequent contributions 131

Chapter 5. Application of the results.....133

Section 1. Application 133

Section 2. Publications 134

Chapter 6. References.....140

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	28
제 1 절	연구개발의 필요성	28
제 2 장	국내외 기술개발 현황	38
제 1 절	국내 타 연구기관의 기술관련 현황	38
제 2 절	국외 타 연구기관의 기술 관련 현황	38
제 3 절	현 기술상태의 문제점	40
제 3 장	연구 개발 수행 내용 및 결과	41
제 1 절	시중 유통 축산물에 오염된 <i>Campylobacter</i> 특성 조사	41
제 2 절	<i>Campylobacter</i> 진단 kit에 대한 사용자 설문조사	68
제 3 절	<i>Campylobacter</i> 특이 항원제조 및 단클론 항체 제조	76
제 4 절	고성능 진단 kit의 제품화	105
제 5 절	진단 kit의 유효성 평가	114
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	129
제 1 절	목표달성도	129
제 2 절	관련분야에의 기여도	132

제 5 장	연구개발결과의 활용계획	134
제 1 절	활용계획	134
제 2 절	논문발표실적	135
제 6 장	참고문헌	140

표 목차

Table 1. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food	30
Table 2. 2005년도 일본에서의 식중독 세균 발생 현황	31
Table 3. OECD국가 중 식중독사고 현황 (WHO, 2003)	32
Table 4. 2005년도 식중독 세균 발생 현황	35
Table 5. 선진국 Rapid 진단 kit 제품개발 현황	39
Table 6. 오염원별 <i>Campylobacter</i> spp. 분리동정결과	46
Table 7. 분리동정된 <i>Campylobacter</i> 균 List	49
Table 8. 설문 조사 방법	68
Table 9. 설문자의 특성	69
Table 10. 병원성세균 인지정도	70
Table 11. 주 원인균 인지정도	71
Table 12. 병원성세균 분리 · 확인시험	73
Table 13. 검출 키트의 사용 의향	74
Table 14. Colloidal gold 용액의 안정화를 위한 항체 최소농도 측정을 위한 salt titration	105
Table 15. <i>Campylobacter</i> 의 순수배양액을 이용한 rapid test의 민감도 조사	120
Table 16. <i>Campylobacter</i> 로 spiling한 식품증균배양액을 이용한 rapid test의 민감도 조사	121
Table 17. non- <i>Campylobacter</i> 균주를 이용한 rapid test 및 ELISA의 특이도 조사	124
Table 18. Rapid test를 이용한 식품검사과정의 유효성 평가	125
Table 19. 시중 유통 식품검체를 이용한 field test	126

그림 목차

Figure 1. <i>Campylobacter</i> 진단 kit 그림 모식도	39
Figure 2. PCR을 통한 <i>C. jejuni</i> and <i>C. coli</i> 확인	47
Figure 3. Real time PCR을 통한 <i>Campylobacter jejuni</i> 와 <i>coli</i> 검출	48
Figure 4. <i>CadF</i> gene PCR product	57
Figure 5. PFGE pattern for <i>Campylobacter jejuni</i> 1 ~ 23	60
Figure 6. PFGE pattern for <i>Campylobacter jejuni</i> 25 ~ 45	60
Figure 7. PFGE pattern for <i>Campylobacter jejuni</i> 47 ~ 68	61
Figure 8. PFGE pattern for <i>Campylobacter jejuni</i> 69 ~ 91	61
Figure 9. PFGE pattern for <i>Campylobacter coli</i> 1 ~ 20	62
Figure 10. PFGE pattern for <i>Campylobacter coli</i> 21 ~ 39	62
Figure 11. PFGE pattern for <i>Campylobacter coli</i> 41 ~ 60	63
Figure 12. PFGE pattern for <i>Campylobacter coli</i> 61 ~ 82	63
Figure 13. PFGE pattern for <i>Campylobacter coli</i> 83 ~ 103	64
Figure 14. PFGE pattern for <i>Campylobacter jejuni</i> 임상균주	64
Figure 15. PFGE dendrogram	67
Figure 16. 병원성세균 인지정도	70
Figure 17. 주 원인균 인지정도	71
Figure 18. 문제가 된다고 생각되는 식품의 우선순위	72
Figure 19. 식중독 세균 등의 분리·확인을 위한 제품 사용 유무	73
Figure 20. 검출 키트의 사용 의향	75
Figure 21. 마우스에 대한 항원의 복강 및 미정맥 투여	80
Figure 22. 단클론항체 제조과정 도식	81
Figure 23. 마우스 복강내 feeder cell 채취 및 배양	83
Figure 24. Hybridoma cell colony	84
Figure 25. ELISA 결과	85
Figure 26. 진단 kit의 구성도	102

Figure 27. 양성표준물질을 적용하여 양성 결과가 나온 경우	103
Figure 28. 음성표준물질을 적용하여 음성 결과가 나온 경우	103
Figure 29. Gold conjugation	107
Figure 30. Kit의 도식	108
Figure 31. 완성된 pad	109
Figure 32. Absorbent pad	109
Figure 33 Sample pad	110
Figure 34. Gold-colloid conjugate pad	110
Figure 35. Gold conjugation	111
Figure 36. nitrocellulose membrane	111
Figure 37. Kit의 제조공정	113
Figure 38. <i>Campylobacter</i> 의 순수배양액을 이용한 rapid test의 민감도 조사	120
Figure 39. <i>Campylobacter</i> 로 spiling한 식품증균배양액을 이용한 rapid test의 민감도 조사	122

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

- *Campylobacter*는 1972년 설사증 환자에서 처음 분리에 성공한 이후, 북미, 유럽, 남미, 호주 등 여러 나라에서 이 균의 감염에 의한 집단 환자 발생이 문제시되고 있으며, 2001년 미국 보건성의 미국내 주요 5개 주를 5년에 걸쳐 조사한 식품유래 식중독 발생현황에 의하면 가장 높은 식중독 원인균은 43.0%의 *Campylobacter*균으로 밝혀졌으며, 그 다음이 *Salmonella*, *Shigella* 이고, 매년 *Campylobacter*에 의한 감염이 증가 추세에 있다.
- *Campylobacter*는 미호기적 환경 (O_2 5%, CO_2 10%, N_2 85%)에서 생육하며 감염은 음식을 통한 경구감염으로서 *Campylobacter*에 오염된 음식을 섭취한 경우나 직·간접적으로 환자 분변이 입을 통하여 체내로 들어온 경우에 감염이 일어난다. 우리나라에서는 살모넬라, 병원성대장균 O157 및 병원성 리스테리아균에 대해 많은 진단 연구되고 있으나 *Campylobacter*에 대해서는 연구가 되어있지 않은 실정이다. 특히 *Campylobacter*균은 식수 및 식품내에서 VNC(viable but nonculturable)상태로 있을 수 있는데, 일반배지배양으로 배양되지 않아 식중독사고가 일어난 후에도 그 원인체를 분리할 수 없었다.
- 국내에서는 현재까지 *Campylobacter* 진단시약이 개발되어 있지 않은 상태로 검사에 소요되는 진단시약을 전량 수입해야 하는 실정이며 *Campylobacter* 균에 대한 위해도가 *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 등의 병원성 세균에 비해 상대적으로 문제시되지 않는 것으로 평가되고 있다. 하지만, 비교적 적은 농도의 감염으로도 감염증을 나타내고 있으며, 최근 외국의 여러 보고서에서도 *Campylobacter* 감염증은 다른 병원성 세균의 감염증에 비하여 월등히 높은 발병률을 보이고 있다.
- 따라서 우리나라에서도 검출에 어려움이 있는 *Campylobacter*에 대한 신속한 검출 및 분리 동정기법을 확립하여 신속한 확인 및 오염이 되어 있는 정도를 파악하고 이에 대한 예방조치를 강구하기 위한 연구를 실시하여야 한다. 이에 본 연구에서는 축산물

중 *Campylobacter*균에 대한 신속검출기법에 대한 연구를 시행함으로써 안전하고 위생적인 축산물이 국민에게 제공되도록 하여 국민보건에 기여하고자 하였다.

1. 경제·산업적 측면

- 미국에서는 식품에 의한 질병 발생이 일년에 700만 case가 보고되고 있으며 그 중에서 5백만 case가 축산물에 의한 발생으로 확인되고 있으며 축산물에 의한 발생건수 중 4,000명이 매년 사망하고 있다. 또한 최근 WTO 출범과 함께 농축산물의 교역이 활발히 진행됨에 따라 농축산물 교역에 의한 특정한 질병의 전파가능성도 더욱 높아지고 있고, 우리나라에서도 질병전파의 예외지역이 될 수 없는 실정이다. 따라서 미국을 비롯한 선진국들은 이와 같은 질병 발생 원인균을 신속히 진단하여 효율적 예방대책 수립과 함께 진단법도 다각적으로 모색하고 있다.
- 그 중에서도 특히 *Campylobacter*의 질병 발생률은 매우 높아 이에 대한 신속하고 간편하며 성능이 우수한 진단시약 개발이 절실히 요구되어 일부 선진국에서는 다양한 종류의 *Campylobacter* 진단 kit가 개발되어 있어 각종 식품오염검사에 유용하게 쓰여지고 있으며 국내의 경우도 백화점 등 식품 판매업소 및 축산물 관련 제조업소, 시도 가축위생시험소 등에서 수입진단 kit가 활용되고 있으며 향후 분쇄육, 생야채즙 등에서는 식품공진상 관리대상으로 지정될 예정이어서 검사건수는 더욱 늘어날 전망이다. 하지만 국내에서는 현재까지 *Campylobacter* 진단시약이 개발되어 있지 않은 상태로 검사에 소요되는 진단시약을 전량 수입하고 있는 실정이다.
- 이에 국내에서 분리된 *Campylobacter* 특이 항원에 대한 항체를 사용하여 *Campylobacter* 진단 kit을 국내에서 개발한다면 현재 수입되어 사용되고 있는 외국 수입시약의 대체에 의한 외화절감은 물론 수출에 의한 외화획득으로 국가경제에 이바지할 수 있을 것이다.

2. 사회 · 문화적 측면

- 미국에서는 *Campylobacter*균을 매년 식중독 발생 주 원인균으로 추정하고 있음. 2005년 미국 질병관리본부는 미국내 주요 10개 주(California, Colorado, Connecticut, Georgia, Maryland, Minnesota, New Mexico, New York, Oregon, Tennessee)에 대해 식품유래 식중독 발생현황을 조사한 결과, 식중독을 많이 발생케 한 원인균으로 *Salmonella*균으로 인구 10만명 당 14.55명이었으며, 다음으로 *Campylobacter*균이 인구 10만명 당 12.75명이 발생하였고, 그 다음이 *Shigella*, *Cryptosporidium*로 조사되었음(Table 1 참조).

Table 1. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food --- 10 States, United States, 2006

Pathogen	States										Overall 2005	National health objective
	California	Colorado	Connecticut	Georgia	Maryland	Minnesota	New Mexico	New York	Oregon	Tennessee		
<i>Campylobacter</i>	27.96	19.37	15.47	6.52	7.23	16.51	18.28	11.70	17.69	6.98	12.72	12.30
<i>Listeria</i>	0.31	0.08	0.57	0.28	0.34	0.29	0.21	0.42	0.31	0.19	0.30	0.25
<i>Salmonella</i>	13.99	13.30	13.36	21.75	14.14	11.33	13.45	11.29	10.46	13.74	14.55	6.60
<i>Shigella</i>	8.70	3.95	1.66	7.48	1.78	1.90	6.94	1.53	2.36	8.49	4.67	N/A¶
STEC** O157	0.87	1.02	1.23	0.39	0.47	2.35	0.53	1.71	1.84	0.78	1.06	1.00
STEC non-O157	0.16	0.12	0.57	0.09	0.68	0.80	0.53	0.25	0.22	0.03	0.33	N/A
<i>Vibrio</i>	0.69	0.31	0.34	0.24	0.49	0.12	0.05	0.19	0.25	0.08	0.27	N/A
<i>Yersinia</i>	0.87	0.27	0.43	0.29	0.13	0.35	0.11	0.51	0.45	0.31	0.36	N/A
<i>Cryptosporidium</i>	1.43	0.94	2.34	1.64	0.61	3.22	1.05	16.38	1.34	0.73	2.95	N/A
<i>Cyclospora</i>	0.06	0.00	1.00	0.15	0.05	0.00	0.21	0.02	0.11	0.05	0.15	N/A

* Per 100,000 population

** Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.

¶ Not applicable because no national health objective exists regarding infection with this pathogen.

NR : Not reported

- 또한 2005년도 일본의 식중독 발생 현황(일본 후생성 2006년자료)에서도 식중독 사건 발생별로 *Campylobacter*균으로 식중독 발생건수는 652건(56.3%)로 가장 많았으며, 환자수로는 *Salmonella*균이 가장 많은 것으로 보였으나, 두 번째 발생으로 나타난 *Campylobacter*균의 환자수로 나타남. 그 외에 *Vibrio*, *Stapylococcus aureus* 등으로 나타났음.

Table 2. 2005년도 일본에서의 식중독 세균 발생 현황

Pathogen	건수	발생율(%)	환자수	발생율(%)
<i>Campylobacter</i>	652	56.3	3487	19.3
<i>Salmonella</i>	148	12.8	3766	20.9
<i>Vibrio</i>	115	9.9	2303	12.8
<i>Stapylococcus</i>	63	5.4	1948	10.8
<i>Clostridium perfriens</i>	28	2.4	2669	14.8
그 외의 병원대장균	27	2.3	1745	9.7
<i>Esherichia coli</i> O157:H7	24	2.1	105	0.6
<i>Bacillus cereus</i>	16	1.4	324	1.8
원인불명	77	6.6	1209	6.7
기타	9	0.8	498	2.8

출처 : 일본 후생성, 2006년

- WHO의 2003년도 OECD 국가 중 식중독 발생 건수를 살펴보면, *Campylobacter*으로 인한 식중독 발생은 살모넬라와 더불어 가장 많은 식중독을 일으키고 있으며, 전세계적으로 *Campylobacter* 균으로 인한 식중독사고의 주요원인으로 나타났음.
 - *Campylobacter*로 인한 식중독 사고가 가장 많은 나라는 Ireland, Norway, Sweden, Switzerland, Iceland, United Kingdom, Australia, New Zealand, Canada, Denmark, Finland 등으로 나타났으며, 그 외에는 *Salmonella* spp.으로 식중독 사고가 있어나는 국가가 많은 것으로 나타나 *Campylobacter*는 전세계적으로 식중독 발생의 주요원인으로 대책으로 나타남.

Table 3. OECD국가 중 식중독사고 현황 (WHO, 2003)

Regions/ Countries	Hungary 1998	Iceland 2001	Ireland 2000	Italy 1998	Luxembourg 1998	Netherlands 2001	Norway 2001	Poland 1998	Portugal 1998
<i>Bacillus cereus</i>	177 (1.8)	-	-	-	-	-	-	-	3 (0.03)
<i>Brucella</i> spp.	-	-	15 (0.4)	1,461 (2.6)	-	3 (0.02)	2 (<0.01)	-	817 (7.9)
<i>Campylobacter</i> spp.	207 (2.0)	214 (79.9)	2,085 (57.5)	-	-	-	2,889 (64.2)	-	-
<i>Clostridium botulinum</i>	19 (0.2)	-	-	33 (0.1)	-	-	-	93 (0.2)	17 (0.2)
<i>Clostridium perfringens</i>	83 (0.8)	14 (4.9)	9 (0.2)	-	-	-	-	-	1 (0.01)
<i>Escherichia coli</i> VTEC	-	-	-	-	-	43 (0.3)	-	-	1 (0.01)
<i>Escherichia coli</i> Non-VTEC	13 (0.1)	1 (<0.01)	35 (1.0)	-	-	-	15 (0.3)	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	45 (0.1)	-	-	18 (0.4)	-	-
<i>Salmonella</i> , Typhoidal	-	-	-	-	49 (12.6)	17 (0.1)	18 (0.4)	-	-
<i>Salmonella</i> , non-typhoidal	18,107 (179.3)	166 (58.0)	640 (17.6)	14,358 (25.1)		4,384 (30.6)	1,899 (42.0)	26,675 (69.0)	643 (6.2)
<i>Shigella</i> spp.	645 (6.4)	-	71 (2.0)	-	-	-	189 (4.2)	-	10 (0.1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (<0.01)	12 (4.2)	7 (0.2)	-	-	-	-	375 (1.0)	9 (0.09)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-	123 (2.8)	-	-

Regions/ Countries	Slovak Republic 1998	Spain 1998	Sweden 2001	Switzer land 1998	Turkey 1998	United Kingdom 2000	Australia 2000	New Zealand 2001
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	21 (0.6)
<i>Brucella</i> spp.	-	1,545 (3.9)	-	-	12,330 (19.6)	-	27 (0.1)	-
<i>Campylobacter</i> spp.	1,304 (26.1)	4,389 (11.1)	8,577 (96.3)	5,455 (76.5)	-	55,887 (95.0)	13,595 (107.1)	10,148 (271.5)
<i>Clostridium botulinum</i>	5 (0.1)	13 (0.03)	-	-	120 (0.2)	-	2 (<0.01)	59 (1.6)
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	-	-	-	-	16 (0.4)
<i>Escherichia coli</i> VTEC	521 (10.4)	-	95 (1.1)	-	-	986 (1.5)	-	76 (2.0)
<i>Escherichia coli</i> Non-VTEC		-	-	-	-	-	33 (0.2)	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	16 (0.04)	67 (0.8)	-	-	100 (0.2)	67 (0.3)	18 (0.5)
<i>Salmonella</i> , Typhoidal	1 (0.02)	316 (0.8)	10 (0.1)	3,004 (42.1)	30,269 (48.1)	14,844 (25.2)	58 (0.3)	26 (0.7)
<i>Salmonella</i> , non-typhoidal	21,471 (398.3)	6,653 (16.8)	4,711 (52.9)		-		6,151 (32.1)	2,417 (64.7)
<i>Shigella</i> spp.	1,075 (19.9)	170 (0.4)	540 (6.1)	499 (7.0)	1,457 (2.3)	966 (1.6)	487 (3.8)	157 (4.2)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	429 (4.8)	-	-	-	-	1,710 (45.8)
<i>Vibrio</i> (excluding cholerae and vulnificus)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	425 (1.1)	579 (6.5)	51 (0.7)	-	27 (0.05)	73 (0.6)	429 (11.5)

Regions/ Countries	Canada 1999	Austria 1998	Belgium 2000	Czech Republic 1998	Denmark 2001	Finland 2001	France 1998	Germany 1998	Greece 1998
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brucella</i> spp.	-	1 (<0.01)	-	-	18 (0.3)	1 (<0.01)	-	18 (0.02)	440 (4.2)
<i>Campylobacter</i> spp.	11,500 (37.7)	2,454 (30.3)	7,473 (73.0)	-	4,620 (86.4)	3,969 (76.4)	-	60 (0.1)	136 (1.3)
<i>Clostridium botulinum</i>	-	-	-	6 (0.1)	-	-	28 (0.05)	21 (0.02)	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> VTEC	1,490 (4.9)	17 (0.2)	47 (0.5)	126 (1.2)	92 (1.7)	18 (0.3)	98 (0.9)	-	-
<i>Escherichia coli</i> Non-VTEC	-	-	-	-	-	13 (0.3)	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	59 (0.3)	-	48 (0.5)	13 (0.1)	38 (0.7)	28 (0.5)	270 (0.5)	31 (0.04)	1 (<0.01)
<i>Salmonella</i> , Typhoidal	71 (0.2)	12 (0.3)	16 (0.2)	3 (<0.01)	17 (0.3)	245 (4.7)	-	-	-
<i>Salmonella</i> , non-typhoidal	5,611 (18.4)	7,236 (89.3)	14,001 (137.0)	49,045 (476.2)	2,918 (54.5)	2,731 (52.6)	13,668 (23.1)	97,505 (118.6)	922 (8.8)
<i>Shigella</i> spp.	1,084 (3.6)	167 (2.1)	208 (2.0)	511 (4.9)	148 (2.8)	223 (4.3)	941 (1.6)	1,607 (2.0)	92 (0.9)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	16 (0.2)	-	-	-	-	-	94 (0.1)	-
<i>Vibrio</i> (excluding cholerae and vulnificus)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	94 (1.2)	507 (5.0)	-	286 (5.3)	728 (14.0)	-	-	10 (0.1)

자료 : WHO, 2003, The present state of foodborne disease in OECD countries.

* 발생건수 (인구 10만명 당 발생수)

- 우리 나라의 식중독 사고는 1990년 발생건수 32건 환자수 618명인 것이 2001년 93건 6404명으로 환자수가 10년 사이 10배이상 증가하고 있으며, 이들 중 40% 이상은 원인균 및 오염식품조차 파악하지 못하고 있는 실정임(Table 4 참조).
- 지난 2005년 1건의 식중독 발생으로 175명의 환자가 발생하였으며, 원인불명의 식중독 사고의 상당부분은 *Campylobacter*가 차지할 것으로 추정되나 우리나라의 대학병원 및 보건소 등에는 아직까지 *Campylobacter*에 대한 분석방법 등이 없거나 혹 있다면도 그 중요성에 대한 인식이 없어 *Campylobacter*의 동정 실험이 이루어지지 않는 것으로 사료됨.

Table 4. 2005년도 식중독 세균 발생 현황

구분	<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	병원성 대장균	원인 불명	기타	합계
식중독 사건수	22	16	17	1	1	26	26	28	109건
발병 환자수	753	863	663	24	175	1,883	550	45	5,711명

출처 : 식품의약품안전청, 2006년

- 축산물을 통한 *Campylobacter*의 감염으로 축산인 뿐만 아니라 소비자에게도 막대한 위협으로 작용해 소비자에게 커다란 불안감으로 다가올 것으로 예상됨에 따라 축산인에게는 생산 단가의 하락과 오염원을 제거해야만 하는 불안감 등을 해소시켜야 할 것임.
- 이에 축산물의 생산, 가공 및 소비에 이르기까지 철저한 연구 조사와 대책으로 농축산물 생산품에 대한 신뢰를 구축할 수 있어야 하며 축산물 안전과 인체 위험성을 유발하는 근본적인 원인을 제거하고 필요한 대책 마련은 사회적, 문화적인 측면에서 매우 시급한 실정이므로 제안과제 수행의 필요성이 있음.

3. 기술적 측면

- *Campylobacter*는 1972년 설사증 환자에서 처음 분리에 성공한 이후, 북미, 유럽, 남미, 호주 등 여러 나라에서 이 균의 감염에 의한 집단 환자 발생이 문제시되고 있다. 2001년 미국 보건성의 미국내 주요 5개 주(Connecticut주, Minnesota주, Oregon주, California주, Georgia주)를 5년에 걸쳐 조사한 식품유래 식중독 발생현황에 의하면 가장 식중독을 많이 발병하게 한 원인균은 43.0%의 *Campylobacter*균으로 밝혀졌으며, 그 다음이 *Salmonella*, *Shigella*로 조사되었다. 매년 *Campylobacter*에 의한 감염이 증가 추세에 있다.
- 하지만 우리 나라의 경우 배양조건이 까다로움에 따라 일선 보건소 등에 이 방법이 확립되지 않아 환자가 발생함에도 불구하고 올바른 진단을 하기 어렵다. 또한 우리 나라 식문화가 점점 서양식으로 바뀌어가고 있는 이 시점에 *Campylobacter*에 의한 오염은 간과할 수 없는 상태라 할 수 있다.
- *Campylobacter*는 미호기적 환경 (O_2 5%, CO_2 10%, N_2 85%)에서 생육하며, 발육온도는 30~45℃에서 발육하고 4℃의 습도가 적절한 미호기 조건에서는 2 ~ 4주, -20℃에서는 2~5달간 생존이 가능하다. 또한 *Vibrio cholerae*의 enterotoxin(CT), *E. coli* enterotoxin(LT)와 유사한 enterotoxin(CJT)이라는 독소를 분비하며, polymixin 함유배지, 42℃, 24시간 배양시 최대 생산되는 것으로 보고되어지고 있다. 감염은 음식을 통한 경구감염으로서 *Campylobacter*에 오염된 음식을 섭취한 경우나 직·간접적으로 환자 분변이 입을 통하여 체내로 들어온 경우에 감염이 일어난다. 즉 감염 경로는 주로 오염된 식품의 섭취에 의하며 대부분 조리가 덜된 닭, 칠면조 등의 가금류와 원유 등이 *Campylobacteriosis*의 주요 원인이 되며, 소, 개, 고양이 및 야생조류 또한 원인이 될 수 있다. 샘물, 강물 등의 표면수도 오염될 수 있으며, 소독이 불완전한 식수도 원인이 될 수 있다.
- 사람에게서 *Campylobacter* 감염증은 *C. jejuni*, *C. coli* 원인이 되어 발생하는 장염이며, 잠복기는 2 ~ 10일 정도이며, 식중독을 일으키는 감염량은 약 500~800 정도로 매우 소량, 유아 및 면역이 저하된 사람들의 감염율이 높으며, 주된 증상은 설사가 가장 보편적이며, 열, 메스꺼움, 복통 및 구토 등도 나타나며, 아주 드문 경우지만 신경계 질환인 길랑-바레 증후군(Guillain Barre syndrome; GBS)을 일으킬 수 있다.

- Guillain-Barre 증후군은 *Campylobacter*균의 감염에 의해 유발되는 신경계 질환으로 마비성의 증상을 보이게 되는데, 4-9세 사이의 소아에서 흔히 발생하며 사지의 마비와 동통이나 지각 이상이 동반되기도 하며, 뇌신경 마비뿐만 아니라 얼굴의 신경 마비가 가장 흔하게 보인다. 호흡근의 마비는 중증 환자에서 흔히 보이는 합병증이며, 그 외에 교감 신경이 침범되면 부정맥, 고혈압, 체위성 저혈압이 나타날 수 있고 위치 감각의 장애, 통각, 촉각의 순으로 보이게 된다. 마비는 발병 후 1-2주 동안에 심해져 최고에 이르게 되나, 2-4주 경부터 증상이 차차 회복되기 시작하며, 대부분은 2개월 이내에 회복되기도 하나, 호흡 장애나 인후두 마비와 같은 중독 증상이 동반되면 사망하는 경우도 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 타 연구기관의 기술관련 현황

- 국내 연구기관에서의 *Campylobacter*의 연구는 일부 수의과대학과 정부 방역·보건관련 연구기관에서 일부 진행되고 있으나 몇 개의 연구기관을 제외하고는 검사업무가 주종을 이루고 있으며 심도있는 연구개발은 이루어지고 있지 않다. 또한 *Campylobacter*의 국내 제조 진단 kit는 아직 개발되어 있지 않다. 그러나 유사한 병원성 미생물 등을 검사하는 효소면역 측정법을 이용한 ELISA 제품과 면역크로마토그래피 기술을 이용한 rapid test kit 개발은 최근 일부 제약회사에서 활발히 이루어지고 있다.

제 2 절 국외 타 연구기관의 기술 관련 현황

- 현재 미국을 비롯한 유럽, 호주 등의 선진국에서는 식품 중에 오염되어 인체에 위해를 끼치는 *Campylobacter*에 대한 예방과 치료대책을 수립하기 위해 신속한 진단기술을 개발하여 자국에서 널리 사용하고 있으며 이러한 진단 kit 제품들을 전세계 국가로 수출하고 있다.
- 현재 사용되고 있는 *Campylobacter*의 측정기술은 3가지로 분류할 수 있다. 첫째방법은 초기에 개발된 방법으로 이 균주가 Hippurate hydrolysis 할 수 없는 것과 Indoxyl acetate 반응에서 양성인 것을 이용하여 균주를 확인하는 전통 배양 방법이며, 둘째, DNA 증폭진단기술의 방법은 PCR(Polymerase chain reaction)을 이용하여 균주의 특정 DNA 증폭하여 진단하는 방법이며, 셋째, 항체를 이용하여 이 균주의 특이항원을 측정하여 검사하는 면역분석검사법이 있다.
- 이 중 대량의 검체를 신속하고 간편하게 검사할 수 있는 기술방법은 PCR 및 효소면역 측정법에 의한 검사방법이 있으나, PCR의 경우는 고가의 장비가 필요하여 한정된 실험실에서만 가능하며, 야외에서 간편하고 신속하게 결과를 알아내기 위해서는 오히려 바람직하지 못한 방법이다. 반면, 효소면역측정법은 야외에서 간편하게 실행할 수

있으면서도 타 균주와의 교차반응이 적고 민감도가 우수하여 외국의 많은 진단 시약 전문회사들이 효소면역 기술을 이용한 ELISA kit과 면역 크로마토그래피법을 이용한 신속한 검사 kit을 개발하여 시판 중에 있다(Fig 1, Table 4).

Figure 1. *Campylobacter* 진단 kit 그림 모식도



Table 5. 선진국 Rapid 진단 kit 제품개발 현황

제품명	원리	제조사	국가
singlepath <i>Campylobacter</i>	Immunochromatographic assay	merck	독일
VIDAS <i>Campylobacter</i>	Enzyme Immunoassay	Bimerieux	프랑스
<i>Campylobacter</i> Test kit	latex agglutination	Oxoid	영국
Mcrogen <i>Campylobacter</i>	latex agglutination	Mcrogen Bioproducts Ltd	영국
Campyslide TM Test kit	latex agglutination	Difco & BD	미국
ALERT [®] for <i>Campylobacter</i>	ELISA	Neogen	미국
<i>Campylobacter</i> visual Immunoassay	Immunoassay	Tecra	호주
VIP for <i>Campylobacter</i>	Immunochromatographic assay	Biocontrol	미국
ProSpect [®] <i>Campylobacter</i> Microplate Assay	Enzyme Immunoassay	Remel	미국
EiaFoss <i>Campylobacter</i>	Enzyme Immunoassay	EiaFoss	미국

제 3 절 현 기술상태의 문제점

- 현재 *Campylobacter*의 검사에는 사용이 편리하고 검사과정이 간단·신속하며 대량검사에 적합한 효소면역분석법을 이용한 진단시약들이 가장 널리 사용되고 있다. 이들 진단시약들은 *Campylobacter*가 분비하는 enterotoxin(CJT)에 대한 항체나 *Campylobacter*에 특이한 항체를 사용하여 측정하는 원리를 이용하고 있으므로 항체의 품질에 따라 진단시약의 성능이 결정되고 있다. 이와 관련하여 기존 진단시약들은 진단 kit의 민감도 면이나 타 장내세균과의 교차반응 발생여부 등의 특이도 면에서 많은 문제점이 노출되고 있다.
- 따라서 선진 외국의 진단시약 개발사들은 이와 같은 성능문제를 해결하기 위해 반응성과 특이성이 높은 우수한 품질의 항체들을 개발하는데 많은 노력을 기울이고 있으며 최근 일부 선두기업들은 우수한 품질의 단클론 항체를 개발하여 기존에 사용하던 다클론 항체와 조합하여 특이도 및 민감도를 더욱 향상시킨 제품들의 개발에 성공하고 있다.
- 국내에서는 그 동안의 진단시약개발 경험을 통해 다클론 및 단클론항체 제조 기술은 어느 정도 확보되어 있으나 고반응성 항체선별이나 항체 대량생산기술에 있어서 기술과 전문인력, 시설 등이 선진국에 비하여 취약하다.
- 진단시약 formulation 및 kit화 기술은 그 동안의 진단시약 개발을 통해 국내에서도 상당히 기술축적이 이루어지고 있으나 산업화 대량 생산기술, 안정성 시험기술, 유효성 평가기술 등은 그 동안의 노력에도 불구하고 아직은 기술과 시설, 경험 및 기술인력 등의 모든 면에서 선진국에 비해 질적·양적으로 취약한 실정이다.
- 국내의 현 기술상태에서 일부 기술들이 선진외국에 비해 취약한 것은 사실이나 본 과제에 참여하는 연구기관들이 그 동안 수행한 선행연구결과와 진단시약 개발경험을 통해 축적한 기술과 시설, 전문인력 등을 체계적으로 활용하여 기술 및 가격경쟁력에서 선진외국에 우위를 점할 수 있는 우수한 제품의 개발에 성공하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 시중 유통 축산물에 오염된 *Campylobacter* 특성 조사

1. 연구방법

가. 시중 유통 축산물에 오염된 *Campylobacter* 분리동정

1) 시판 생닭에서 *Campylobacter*의 분리

- o 시중에서 구입한 생닭 100마리, 돼지고기 50종, 쇠고기 50종을 사용하였다. 생닭은 한 마리를 멸균백에 넣은 다음, Buffered peptone water 400mL를 넣어 균질화 시킨 후, 10mL를 항생제(Cefoperazone 10mg, Vancomycin 10mg, Trimethoprim 10mg, Cyclohexidide 25mg/L)와 5% Horse blood를 첨가한 Bolton broth에 넣은 다음, 미호기성조건(5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂)하에 37℃에서 4시간, 42℃에서 48시간 배양시켰다. 항생제(cefoperazone 32mg, Amphotericin B 10mg)를 첨가한 mCCDA(Modified *Campylobacter* Charcoal Differential Agar)에 접종한 다음 미호기적 조건에서 37℃, 48시간 배양하였다. *C. jejuni* 종은 회색의 축축하고 평평하고 번진 형태의 집락을 형성하고 금속성 광택이 있거나 혹은 없는 녹색 혹은 건조된 외형을 가진 것도 접종하였다. *C. coli* 종은 색상에서 크림형 회색, 축축하고 약간 올라온 콜로니를 취하였다.

2) 생화학적 확인

가) 일반시험법

- (1) 그람염색 : 그람음성 간균으로 갈매기 날개 모양이나 S형으로 보인다.
- (2) 운동성 시험: 균집락을 영양 액체배지 또는 Mueller-Hinton Broth로 부유시킨 후 위상차 현미경이나 광학 현미경으로 관찰하였다. (*Campylobacter*는 빠르게 전진하는 운동성(darting/tumbling)을

보인다.

(3) Catalase 시험 : Brucella 배지에서 24-48시간 배양하여 자란 집락에 과산화수소(3% H₂O₂) 몇 방울을 떨어뜨렸을 때 거품이 생긴 양성을 확인하였다.

(4) Oxidase 시험 : Brucella 배지에서 자란 집락에 Kovac's reagent를 떨어뜨렸을 때 진한 자주색으로 변하거나, Oxoid Oxidase Identification Touch stick BR64를 사용했을 때 청 자주색으로 변하면 양성을 나타내었다.

나) 혈청학적 검사법

o 라텍스 슬라이드 응집(Oxoid, UK)으로 *C. jejuni*, *C. lari*, *C. coli*를 검출하는 키트가 상품화되어 있으며 균속 수준까지 동정이 가능하다. 이 검사법은 각 균종의 세포벽 항원을 검출하는 것으로 항원 추출액과 세포벽 항원에 대한 특이 항체가 붙어있는 라텍스 부유물을 혼합한 후 응집여부로 결과를 판정하였다.

다) 분리 동정

o 호열성 *Campylobacter*속(*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*)는 42°C에서 잘 자란다. 이들 균은 hippurate 가수분해능, indole acetate 가수분해능, H₂S 생성능, 항생제 내성 등으로 감별하였다.

- Hippurate 가수분해 : 혈액 한천배지에 자란 집락을 1% hippurate 수용액 0.4 ml에 접종한 후 37°C water bath에 2시간 두었다가 관찰한 다음 진한 자주빛이 양성이고 약한 청색은 음성을 나타내었다.

- Indoxyl acetate 가수분해 : 10% indoxyl acetate를 적신 paper strip이나 disc를 올린 후 공기 중에 말린다. 상온에서 10분 지난 후 관찰하였을 때 blue/grey 색을 나타낸 양성 반응을 선별하였다.

라) Polymerase Chain Reaction (PCR)에 의한 확인

(1) *C. jejuni*와 *C. coli*를 동정하기 위하여 Gonzalez 등 primer를 사용하였다. 이번 primer는 각각의 세균내의 siderophore transport 유전자로써 *C. jejuni*의 CeuE 유전자 JEJ1 (5' CCTGCTACGGTGAAAGTTTTC 3'), JEJ2 (5'GATCTTT TTGTTTTGTGCTGC 3'), *C. coli*의 CeuE 유전자 COL1 (5'ATGAAAAAAT ATTTAGTTTTTGCA 3'), COL2 (5' ATTTTATTATTTGTAGCAGCG 3')를 사용하였다. 반응조건은 100ng 의 template(GuCN 방법이용)와 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 3.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.2 mM dNTPs, 100 pmole, 1 unit Taq polymerase으로 하였으며, Perkin-Elmer 9700으로 30 cycle, denaturing step (30 s, 94°C), primer annealing (30 s, 57°C), chain extension (1 min, 72°C). 추가 extension step (5 min, 72°C) 반응을 실시하였다.

(2) CeuE: 34.5 to 36.2 kDa 의 lipoprotein component로서 *C. jejuni*와 *C. coli*에서 binding-protein-dependent transport system의 역할을 한다.

마) Real Time Polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 확인반응

(1) RT-PCR 조건

(가) Real Time PCR은 최근 기존의 PCR 방법보다 신속하고, 높은 감도로 증폭이 되며, 오염을 줄일 수 있는 장점을 가진 방법이다. PCR 반응과 같이 반응조건은 1X TaqMan buffer A, 5mM MgCl₂, 200 μM each dATP, dCTP, and dGTP; 400 μM dUTP, 0.02 μM *C. jejuni*-specific probe, 0.3μM *C. jejuni*-specific primer, 1 U of AmpErase uracil N-glycosylase, 2.5U of AmpliTaq Gold DNA polymerase을 실시하였으며 *C. jejuni*를 위해서는 Hippurcase 검출을 위한 primer (Primer express 1.0을 이용하여 design 인 5'CTGCTTCTTTACTTGTGTGGCTTT 3'와 5'GCTCCTATGCTTACAAC TGCTGAAT 3'와 FAM 5'CATTGCGAGATACTTGCTTTG 3'의 probe를 이용하였다.

(나) 또한 *C. coli*를 검출하기 위해서는 CeuE gene을 검출하는 primer인 5'GATA

AAGTTGCAGGAGTTCCAGCTA 3'과 5'AACTCCACCTATACTA GGCT TGTCT 3' 그리고 probe 5'에 FAM 부착된 5'CTGTAAGTATTTT GGCA AGTTT 3'를 이용하였으며, AmpErase uracil N-glycosylase를 50°C에서 5분간 처리함으로써 오염된 PCR product를 제거시켜 주었으며, 95°C에서 10분간 가열한 다음, 95°C에서 20초간, 60°C에서 1분간 annealing 및 extension을 모두 40 cycle을 실시하고 ABI SDS 7700의 program을 통해서 실험결과를 확인하였다.

나. *Campylobacter* 균주 특성 파악

1) Pulse Field Gel Electrophoresis(PFGE)에 의한 균주 연관성 확인

- 가) Pulsenet(CDC, USA)의 rapid PFGE protocol에 준하여 시행하였다. 즉, Brucella Agar에서 37°C, 24시간 배양 한 균집락을 Cell suspension buffer (CSB, 29mM Tris-Cl(pH 8.0), 20mM NaCl, 50mM EDTA))에 풀어 McFarland 탁도 No. 3.0으로 맞추었다. 이 중 1mL를 원심분리한 후 2X CSB 넣은후 1% SKG agarose(SeaKem Gold agarose, FMC)와 섞어 plug mold에 분주하였다.
- 나) 1mg lysoyme를 넣은 CSB 1mL에 37°C water bath에서 4시간동안 반응시킨다. 200µL 의 Proteinase K buffer(20mM Tris(pH 8.0), 50m EDTA)로 풀어 proteinase K 50µL(10mg/mL) stock solution)넣고 잘 섞은 다음 50°C water bath에서 overnight 시킨다. Lysis가 끝난 plug를 각각 washing buffer(20mM Tris(ph8.0), 50mM EDTA)로 상온에서 1시간씩 모두 4회를 실시하였다.
- 다) 세척이 끝난 plug를 *Sma*I(Takara)이 포함된 *Sma*I buffer 100µL에 넣어 30°C에서 overnight digestion하였다. 처리를 마친 plug와 size maker(lambda ladder PFG maker E또는 low range PFG maker, New England Biolabs)를 0.5X TBE에 녹인 1% SKG agarose gel의 well에 끼우고, 1% low melting agarose(sea plaque GTG, FMC)로 빈틈을 채운다음 agarose 판을 CHEF mapper(Bio-Rad)에 장착하고, auto algorithm으로 14°C, initial swich time 6.75s, final switch

time 38.35s, gradient 6V/cm, included angle 120, running time 18h로 전기 영동하였다.

라) 전기영동이 끝난 agarose 판을 EtBr용액(3 µg/mL)에 침지하여 15분간 염색하고, 증류수로 30분간 세척한 다음 자외선 조사 하에서 확인하였다. 촬영된 agarose gel 사진을 scanning하여, Molecular Analyst 1.0(Bio-rad) program으로 분석하였다. Similarity는 band based similarity coefficient중 dice coefficient로 계산하였고, clustering에는 Ward algorithm을 상용하였다.

2) CadF 유전자 존재 PCR 확인 및 염기서열 결정

가) CadF(Campylobacter adhesion to fibronectin)

- (1) 37-KD의 Outer membrane protein
- (2) 장상피세포의 부착에 관여하며 감염이 이루어지는데 필수적인 역할을 담당
- (3) *C. jejuni*와 *C. coli*에 고유하게 존재

나) *C. jejuni*와 *C. coli*의 CadF 유전자를 확인하기 위하여 동정하기 위하여 Konkel ME 등의 논문에 기재된 primer { cadF-F38 forward primer (5'-ATG AAA AAG TTA TTA CTA TGT TTA GG-3'), cadF-R20 reverse primer (5'-AGG ATA AAT TTA GCA TCC-3')}를 사용하였으며, 조건은 100ng 의 template와 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.2 mM dNTPs, 100 pmole, 2.5 unit Taq polymerase으로 하였다.

다) Perkin-Elmer 9700으로 30 cycle, denaturing step (1 min, 94°C), primer annealing (1 min, 45°C), chain extension (1 min, 72°C). 추가 extension step (10 min, 72°C) 반응을 실시한 다음 PCR product를 PCR Quick spin(Intron사)를 이용하여 정제한 후 염기서열을 ABIprism(Applied biosystems, USA)을 사용하여 결정하였다. 또한 염기서열 비교 및 단백질 서열 분석은 seqman program (DNASTar, USA)을 사용하였다.

2. 연구결과

가. 총 330주의 *Campylobacter* 분리 동정

- 생닭 270마리 중 220마리(81.5%)가 검출되었으며, 이중 *C. jejuni* 가 검출된 것은 50종, *C. coli* 만 검출된 것은 80종, *C. jejuni*와 *C. coli*가 동시에 검출된 것은 90종이었다. 돼지고기는 250종 중 4종, 쇠고기는 250종 중 3종이 분리되었다. 임상균주는 2003년도 충북에서 발생한 집단식중독 사고에서 분리된 5종의 *C. jejuni*를 질병관리본부에서 분양받았으며, 서울대학교 의과대학 김 의종 교수로부터 *C. jejuni* 8종을 분양받았다.

Table 6. 오염원별 *Campylobacter* spp. 분리동정결과

구분	생닭	돼지고기	쇠고기	임상균주
<i>Campylobacter jejuni</i>	50종	-	3종	13주
<i>Campylobacter coli</i>	80종	4종	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> & <i>coli</i> 동시검출	90종	-	-	-
분리율 (양성샘플수 / 총샘플수)	81.5% (220/270)	1.6 % (4/250)	1.2 % (3/250)	13주

나. PCR 이용 *Campylobacter jejuni* / *coli* 확인

- *Campylobacter jejuni* 와 *C. coli*를 분리하기 위해 Gonzalez 등의 방법을 사용하였다. 표준균주로 ATCC 33560 *C. jejuni* 와 ATCC 33559 *C. coli*를 사용하였으며, 생닭 돼지고기 및 쇠고기에서 *C. jejuni* (793bp)가 검출되었고, 생닭에서만 *C. coli*(894bp)가 검출되었다. *C. jejuni* 만을 검출하는 primer를 사용한 경우에는 *C. coli*는 검출되지 않았으며(그림(a)), *C. coli* 만을 검출하는 primer를 사용한 경우에는 *C. jejuni*는 전혀 검출되지 않았다(그림(b)).

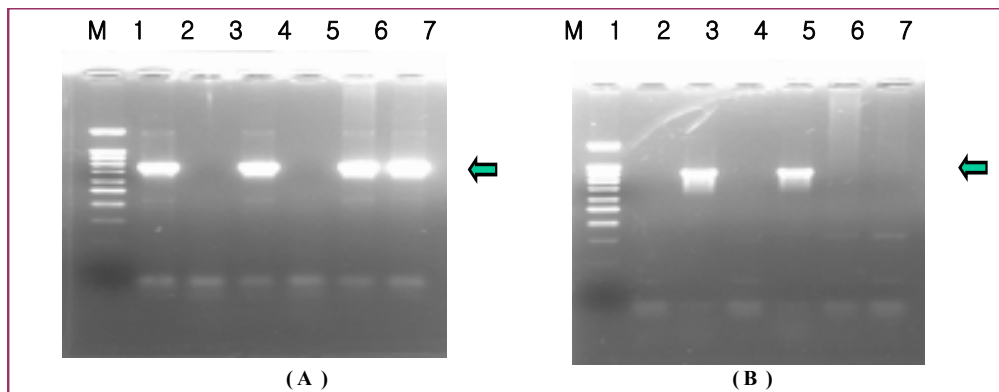
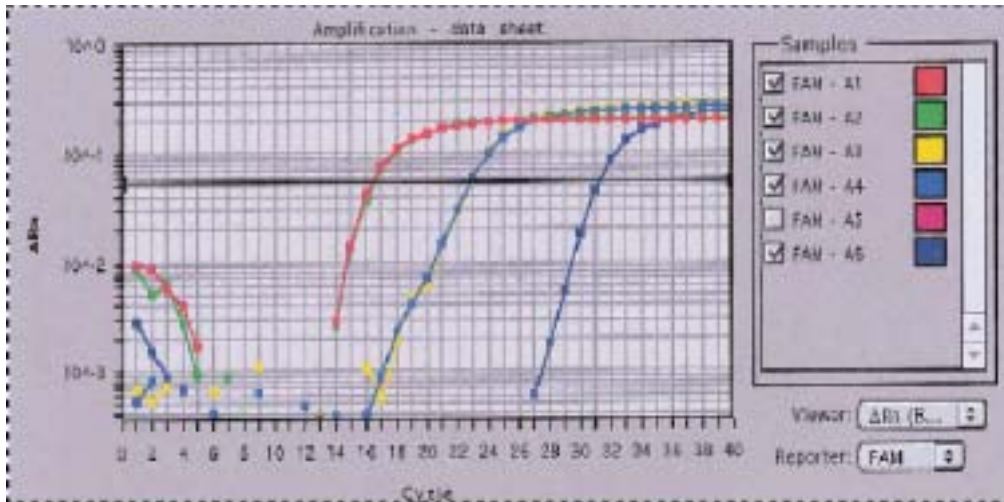


Figure 2. PCR을 통한 *C. jejuni* and *C. coli* 확인

(A) *C. jejuni*-specific primer를 이용한 전기영동 사진(793bp) (B) *C. coli*-specific primer를 이용한 전기영동 사진 (894bp) Lane 1 : *C. jejuni* ATCC 33560, Lane 2 ; *C. coli* ATCC 33559, Lane 3:생닭 유래 *C. jejuni* ; Lane 4 :생닭 유래 *C. coli* ; 5,돼지고기 유래 *C. jejuni*, Lane 6, 쇠고기 유래 *C. jejuni*. Lanes marked M are DNA size marker (1-kb ladder; Intron biotech., Korea)

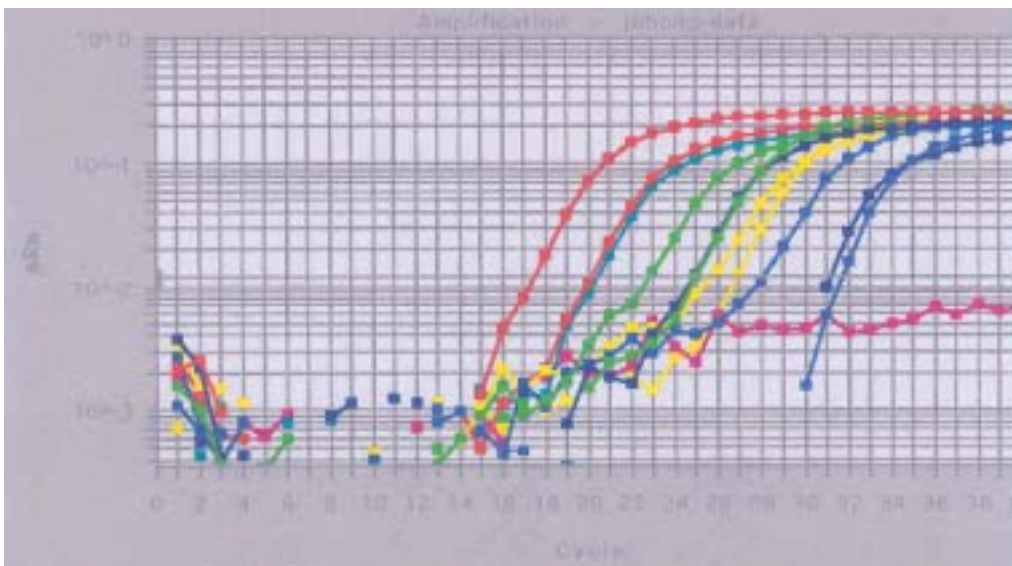
다. Real time PCR을 통한 *Campylobacter* 균 확인 (ABI SDS 7700)

- Real time PCR을 통한 방법은 적은 균량으로도 측정을 할 수 있는 방법으로 반응액에 10 CFU인 경우에도 검출이 가능하다(Nogva 등, 2000). Fig 3에서는 *Campylobacter* spp. 를 검출하기 위해 real time PCR을 이용하였다. Fig 3의 (A)에서는 *C. jejuni*를 검출한 그림으로 A1은 ATCC 33560 *C. jejuni*를 검출한 그림으로 PCR의 15 Cycle 정도부터 측정 가능한 fluorescence를 띄기 시작한 것을 나타냈다. 다른 wide type *C. jejuni*도 반응이 나타남을 알 수 있었다. (B)에서는 B1에 ATCC 33559 *C. coli*를 검출하기 위한 그림으로 17 Cycle에서 측정 가능한 fluorescence를 띄기 시작한 것으로 나타났다. B2에서는 No template로 균의 template를 넣지 않은 것으로 반응이 나타나지 않았다. 나머지 B3부터 B12는 wide type *C. coli* 반응을 한 것으로 반응이 나타남을 알 수 있었다.



(A) *Campylobacter jejuni*의 검출 그림.

A1 : ATCC 33560 *C. jejuni*, A2 : *C. jejuni* 1, A3 : *C. jejuni* 2, A4 : *C. jejuni* 3, A5 : *C. jejuni* 4, A6 : *C. jejuni* 5



(B) *Campylobacter coli*의 검출 그림.

B1 : ATCC 33559 *C. coli*, B2 : No template, B3 : *C. coli* 1, B4 : *C. coli* 2, B5 : *C. coli* 3, B6 : *C. coli* 4, B7 : *C. coli* 5, B8 : *C. coli* 6, B9 : *C. coli* 7, B10 : *C. coli* 8, B11 : *C. coli* 9, B12 : *C. coli* 10

Figure 3. Real time PCR을 통한 *Campylobacter jejuni* 와 *coli* 검출

Table 7. 분리동정된 *Campylobacter* 균 List

균주 번호	Catalase	indoxyl acetate hydrolysis	hippurate hydrolysis	Oxoid latex kit	PCR results	Real time PCR results	Identification	시료구입장소	시료구입일	Source
CC-1	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	신세계 (영등포)	2003. 8. 25	생닭
CC-2	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	하나로 (영등포)	2003. 8. 25	생닭
CC-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	애경 (구로)	2003. 8. 25	생닭
CC-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	애경 (구로)	2003. 8. 25	생닭
CC-5	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	수유시장	2003. 9. 23	생닭
CC-6	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	수유시장	2003. 9. 23	생닭
CC-7	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	수유시장	2003. 9. 23	생닭
CC-8	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	킴스 클럽 (분당)	2003. 9. 1	생닭
CC-9	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	하나로 마트 (양재)	2003. 9. 1	생닭
CC-10	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	킴스 클럽 (분당)	2003. 9. 1	생닭
CC-11	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	킴스 클럽 (분당)	2003. 9. 1	생닭
CC-12	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	하나로 마트 (양재)	2003. 9. 1	생닭
CC-13	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	까르푸 (분당)	2003. 9. 1	생닭
CC-14	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	킴스 클럽 (강남)	2003. 9. 1	생닭
CC-15	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	킴스 클럽 (강남)	2003. 9. 1	생닭
CC-16	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	롯데백화점 (잠실)	2003. 9. 1	생닭
CC-17	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	롯데마트 (잠실)	2003. 9. 1	생닭
CC-18	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	피플스토어 (일원)	2003. 9. 1	생닭
CC-19	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	LG 마트 (문정)	2003. 9. 1	생닭
CC-20	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	가락시장	2003. 9. 1	생닭
CC-21	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	가락시장	2003. 9. 1	생닭
CC-22	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	가락시장	2003. 9. 1	생닭
CC-23	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	새마을 시장 (신천)	2003. 9. 1	생닭
CC-24	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영동시장	2003. 9. 1	생닭
CC-25	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영동시장	2003. 9. 1	생닭
CC-26	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	삼성플라자 (분당)	2003.9.16	생닭
CC-27	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	삼성플라자 (분당)	2003.9.16	생닭
CC-28	+	+	-	+	CJ	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	롯데 백화점 (분당)	2003.9.16	생닭
CC-29	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	롯데 백화점 (분당)	2003.9.16	생닭
CC-30	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	까르푸 (분당)	2003.9.16	생닭
CC-31	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	롯데 마트 (분당)	2003.9.16	생닭
CC-32	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	롯데 마트 (분당)	2003.9.16	생닭
CC-33	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	이마트 (일산)	2003.9.16	생닭
CC-34	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	그랜드 (일산)	2003.9.16	생닭
CC-35	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	까르푸 (일산)	2003.9.16	생닭
CC-36	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	롯데 마트 (일산)	2003.9.16	생닭

균주 번호	Catalase	indoxyl acetate hydrolysis	hippurate hydrolysis	Oxoid latex kit	PCR results	Real time PCR results	Identification	시료구입장소	시료구입일	Source
CC-37	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	롯데 마트 (일산)	2003.9.16	생닭
CC-38	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	역촌 중앙시장	2003.9.16	생닭
CC-39	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	역촌 중앙시장	2003.9.16	생닭
CC-40	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	응암시장	2003.9.16	생닭
CC-41	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	신세계 (미아)	2003.9.23	생닭
CC-42	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	경동시장	2003.9.23	생닭
CC-43	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	경동시장	2003.9.23	생닭
CC-44	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	경동시장	2003.9.23	생닭
CC-45	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	경동시장	2003.9.23	생닭
CC-46	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	경동시장	2003.9.23	생닭
CC-47	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	북부시장	2003.9.23	생닭
CC-48	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	북부시장	2003.9.23	생닭
CC-49	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	수유시장	2003.9.23	생닭
CC-50	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	신당 중앙시장	2003.9.23	생닭
CC-51	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	신당 중앙시장	2003.9.23	생닭
CC-52	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	신당 중앙시장	2003.9.23	생닭
CC-53	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	신당 중앙시장	2003.9.23	생닭
CC-54	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	신당 중앙시장	2003.9.23	생닭
CC-55	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	LG 슈퍼(수유)	2003.9.23	생닭
CC-56	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	성남 중앙시장	2003.9.23	생닭
CC-57	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	성남 중앙시장	2003.9.23	생닭
CC-58	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	광장시장	2003.9.23	생닭
CC-59	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	광장시장	2003.9.23	생닭
CC-60	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	중부시장	2003.9.23	생닭
CC-61	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	경방필 백화점	2002.10.4	생닭
CC-62	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	하나로 (양재)	2002.10.22	생닭
CC-63	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	삼성플라자 분당	2002.10.24	생닭
CC-64	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	하나로 (양재)	2002.10.22	생닭
CC-65	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	엘지마트(송파)	2002.10.5	생닭
CC-66	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	이마트 창동점	2002.10.2	생닭
CC-67	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	코스트코 양재점	2002.10.22	생닭
CC-68	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	가리봉시장	2002.10.22	생닭
CC-69	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	김스클럽 성남	2002.10.24	생닭
CC-70	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	사당 남성시장	2002.10.25	생닭
CC-71	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	쌍문시장	2002.10.2	생닭
CC-72	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	새마을 시장	2002.10.25	생닭
CC-73	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	양재시장	2002.10.25	생닭
CC-74	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영동시장	2002.10.25	생닭
CC-75	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포시장	2002.10.22	생닭

균주 번호	Catalase	indoxyl acetate hydrolysis	hippurate hydrolysis	Oxoid latex kit	PCR results	Real time PCR results	Identification	시료구입장소	시료구입일	Source
CC-76	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	구로시장	2003. 8. 25	생닭
CC-77	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	중부시장	2002.10.2	생닭
CC-78	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	천호시장	2002.10.25	생닭
CC-79	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	태능 시장	2002.10.2	생닭
CC-80	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	한양시장	2002.10.2	생닭
CC-81	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2002.11.3	생닭
CC-82	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2002.11.3	생닭
CC-83	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2002.11.3	생닭
CC-84	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2002.11.3	생닭
CC-85	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2002.11.3	생닭
CC-86	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2002.11.3	생닭
CC-87	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2003. 8. 25	생닭
CC-88	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2002.11.3	생닭
CC-89	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2002.11.3	생닭
CC-90	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	앨지마트(송파)	2002.11.3	생닭
CC-91	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	앨지마트 (송파)	2002.11.3	생닭
CC-92	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	가락시장	2002.11.3	생닭
CC-93	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	가락시장	2002.11.3	생닭
CC-94	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	가락시장	2002.11.3	생닭
CC-95	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	가락시장	2002.11.3	생닭
CC-96	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	가락시장	2002.11.3	생닭
CC-97	+	+	+	+	CJ	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	하나로 (영등포)	2003. 8. 25	생닭
CC-98	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2003.8.25	생닭
CC-99	+	+	+	+	CJ	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2003.8.25	생닭
CC-100	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2003.8.25	생닭
CC-101	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2003.8.25	생닭
CC-102	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2003.8.25	생닭
CC-103	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	영등포 시장	2003.8.25	생닭
CJ-1	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	까르푸 (분당)	2003. 9. 1	생닭
CJ-2	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	롯데 (신대방)	2003. 8. 25	생닭
CJ-3	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	양재시장	2003. 9. 1	생닭
CJ-4	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	이마트 (일산)	2003.9.16	생닭
CJ-5	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	롯데 마트 (일산)	2003.9.16	생닭
CJ-6	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	경동시장	2003.9.23	생닭
CJ-7	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	신당 중앙시장	2003.9.23	생닭
CJ-8	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	사당 남성시장	2003.9.23	생닭
CJ-9	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	봉천 중앙시장	2003. 8. 25	생닭
CJ-10	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	봉천 중앙시장	2003. 8. 25	생닭
CJ-11	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	당곡시장	2003. 8. 25	생닭

균주 번호	Catalase	indoxyl acetate hydrolysis	hippurate hydrolysis	Oxoid latex kit	PCR results	Real time PCR results	Identification	시료구입장소	시료구입일	Source
CJ-12	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	분당 (서박사)	2003. 8. 26	생닭
CJ-13	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	분당 (서박사)	2003. 8. 26	생닭
CJ-14	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	LG 슈퍼(잠원)	2003. 9. 1	생닭
CJ-15	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	김스 클럽 (분당)	2003. 9. 1	생닭
CJ-16	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	김스 클럽 (분당)	2003. 9. 1	생닭
CJ-17	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	하나로 마트 (양재)	2003. 9. 1	생닭
CJ-18	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	롯데 (영등포)	2003. 8. 25	생닭
CJ-19	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	하나로 마트 (양재)	2003. 9. 1	생닭
CJ-20	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	까르푸 (분당)	2003. 9. 1	생닭
CJ-21	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	김스 클럽 (강남)	2003. 9. 1	생닭
CJ-22	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	김스 클럽 (강남)	2003. 9. 1	생닭
CJ-23	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	롯데백화점 (잠실)	2003. 9. 1	생닭
CJ-24	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	피플스토어 (일원)	2003. 9. 1	생닭
CJ-25	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	피플스토어 (일원)	2003. 9. 1	생닭
CJ-26	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	LG 마트 (문정)	2003. 9. 1	생닭
CJ-27	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	해태 슈퍼 (포이동)	2003. 9. 1	생닭
CJ-28	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	경방필 (영등포)	2003. 8. 25	생닭
CJ-29	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	가락시장	2003. 9. 1	생닭
CJ-30	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	삼성플라자 (분당)	2003.9.16	생닭
CJ-31	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	삼성플라자 (분당)	2003.9.16	생닭
CJ-32	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	삼성플라자 (분당)	2003.9.16	생닭
CJ-33	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	삼성플라자 (분당)	2003.9.16	생닭
CJ-34	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	롯데 백화점 (분당)	2003.9.16	생닭
CJ-35	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	까르푸 (분당)	2003.9.16	생닭
CJ-36	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	까르푸 (분당)	2003.9.16	생닭
CJ-37	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	롯데 마트 (분당)	2003.9.16	생닭
CJ-38	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	까르푸 (목동)	2003. 8. 25	생닭
CJ-39	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	롯데 마트 (분당)	2003.9.16	생닭
CJ-40	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	이마트 (일산)	2003.9.16	생닭
CJ-41	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	농협 하나로 (일산)	2003.9.16	생닭
CJ-42	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	월마트 (일산)	2003.9.16	생닭
CJ-43	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	월마트 (일산)	2003.9.16	생닭
CJ-44	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	그랜드 (일산)	2003.9.16	생닭
CJ-45	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	그랜드 (일산)	2003.9.16	생닭
CJ-46	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	롯데 백화점 (일산)	2003.9.16	생닭
CJ-47	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	까르푸 (일산)	2003.9.16	생닭
CJ-48	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	애경 (구로)	2003. 8. 25	생닭
CJ-49	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	까르푸 (일산)	2003.9.16	생닭

균주 번호	Catalase	indoxyl acetate hydrolysis	hippurate hydrolysis	Oxoid latex kit	PCR results	Real time PCR results	Identification	시료구입장소	시료구입일	Source
CJ-50	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	롯데 마트 (일산)	2003.9.16	생닭
CJ-51	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	역촌 중앙시장	2003.9.16	생닭
CJ-52	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	역촌 중앙시장	2003.9.16	생닭
CJ-53	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	신흥시장	2003.9.16	생닭
CJ-54	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	응암시장	2003.9.16	생닭
CJ-55	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	신세계 (미아)	2003.9.23	생닭
CJ-56	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	신세계 (미아)	2003.9.23	생닭
CJ-57	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	경동시장	2003.9.23	생닭
CJ-58	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	매경 (구로)	2003. 8. 25	생닭
CJ-59	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	경동시장	2003.9.23	생닭
CJ-60	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	경동시장	2003.9.23	생닭
CJ-61	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	중앙시장	2003.9.23	생닭
CJ-62	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	중앙시장	2003.9.23	생닭
CJ-63	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	광장시장	2003.9.23	생닭
CJ-64	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	수유시장	2003.9.23	생닭
CJ-65	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	수유시장	2003.9.23	생닭
CJ-66	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	수유시장	2003.9.23	생닭
CJ-67	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	신당 중앙시장	2003.9.23	생닭
CJ-68	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	매경 (구로)	2003. 8. 25	생닭
CJ-69	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	신당 중앙시장	2003.9.23	생닭
CJ-70	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	신당 중앙시장	2003.9.23	생닭
CJ-71	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	LG 슈퍼(수유)	2003.9.23	생닭
CJ-72	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	LG 슈퍼(수유)	2003.9.23	생닭
CJ-73	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	성남 중앙시장	2003.9.23	생닭
CJ-74	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	성남 중앙시장	2003.9.23	생닭
CJ-75	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	모란시장	2003.9.23	생닭
CJ-76	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	광장시장	2003.9.23	생닭
CJ-77	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	풍산시장	2003.9.23	생닭
CJ-78	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	풍산시장	2003.9.23	생닭
CJ-79	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	영등포 시장	2003. 8. 25	생닭
CJ-79	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	중부시장	2003.9.23	생닭
CJ-80	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	태평백화점	2003.9.23	생닭
CJ-81	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	태평백화점	2003.9.23	생닭
CJ-82	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	신세계 영등포	2003. 8. 25	생닭
CJ-82	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	피플스토어 (일원)	2003.9.1	생닭
CJ-83	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	분당 (서박사)	2003.8.26	돼지고기
CJ-84	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	피플스토어 (일원)	2003.9.1	돼지고기
CJ-85	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	해태 슈퍼 (포이동)	2003. 9. 1	쇠고기
CJ-86	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	영동시장	2003. 9. 1	쇠고기
CJ-87	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	영등포 시장	2002.11.3	쇠고기
CJ-88	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	영등포 시장	2002.11.3	생닭
CJ-88	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	영등포 시장	2003. 8. 25	생닭
CJ-89	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	영등포 시장	2003. 8. 25	생닭
CJ-90	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	영등포 시장	2003. 8. 25	생닭
CJ-91	+	+	+	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	영등포 시장	2003. 8. 25	생닭

균주 번호	Catalase	indoxyl acetate hydrolysis	hippurate hydrolysis	Oxoid latex kit	PCR results	Real time PCR results	Identification	시료구입일	Source
1-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
2-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
2-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
3-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
3-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
4-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
4-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
5-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
5-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
6-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
6-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
7-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
8-5	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
9-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
9-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
10-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
10-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
11-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
11-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
12-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
12-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
13-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
13-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
14-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
15-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
15-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
16-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
17-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
17-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
18-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
19-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
19-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
20-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
21-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
21-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
22-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
26-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
28-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
28-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
30-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
36-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
37-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
41-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
43-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
43-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
44-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
44-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭

균주 번호	Catalase	indoxyl acetate hydrolysis	hippurate hydrolysis	Oxoid latex kit	PCR results	Real time PCR results	Identification	시료구입일	Source
45-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
45-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
51-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
52-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
53-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
56-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
57-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
60-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
62-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
63-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
63-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
65-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
71-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
71-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
72-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
73-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
73-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
74-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
74-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
75-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
76-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
78-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
78-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
79-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
79-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
81-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
82-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
82-3	+	+	-	+	CJ	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
83-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
83-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
84-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
85-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
85-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
86-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
86-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
87-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
87-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
88-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
89-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
89-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
91-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
93-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
93-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
96-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
96-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
98-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
98-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭

균주 번호	Catalase	indoxyl acetate hydrolysis	hippurate hydrolysis	Oxoid latex kit	PCR results	Real time PCR results	Identification	시료구입일	Source
99-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
99-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
100-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
101-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
102-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
103-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
105-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
106-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
107-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
108-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
109-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
110-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
110-4	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
115-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
115-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
116-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
117-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
119-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
119-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
122-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
123-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
126-2	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
126-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
127-1	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	생닭
132-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
138-3	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	생닭
cc	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	돼지고기
cc	+	+	-	+	CJ	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2003	돼지고기
cj	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2003	쇠고기
cc	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2003	돼지고기
cc	+	+	-	+	CC	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	2005	돼지고기
cj	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	쇠고기
cj	+	+	-	+	CJ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	2005	쇠고기

라. *CadF* gene PCR 검출 및 염기서열 분석

○ 본 과제의 Target 중의 하나인 *cadF* gene을 PCR로 검출하였더니 모든 *Campylobacter* spp.에 400bp의 특이적 밴드가 관찰되었다. Fig 4에서는 ATCC 33560 *C. jejuni* 및 ATCC 33559 *C. coli* 검출하였으며(CJ1, CJ2, CJ3, CC1, CC2, CC3)에 대한 PCR 결과가 나타났다.

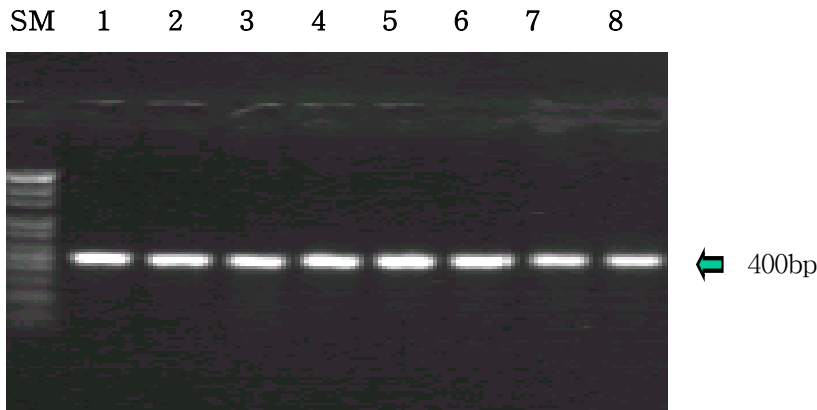


Figure 4. *CadF* gene PCR product

SM: 1 kb ladder (iNtRon biotech., Korea), lane 1 : ATCC 33560 *C. jejuni*, lane 2 : ATCC 33559 *C. coli*, lane 3 : *C. jejuni* 1, lane 4 : *C. jejuni* 2, lane 5 : *C. jejuni* 3, lane 6 : *C. coli* 1, lane 7 : *C. coli* 2, lane 8 : *C. coli* 3

1) *CadF* gene 염기서열 분석

CC1	ATCGCTAT	GCACCAGGGATTAGACTAGGGTATCATTTTGATGATTTTTGGCTT
CC2		GCACCAGGGATTAGACTAGGGTATCATTTTGATGATTTTTGGCTT
CC3		GCACCAGGGATTAGACTAGGGTATCATTTTGATGATTTTTGGCTT
CC4		GCACCAGGGATTAGACTAGGGTATCATTTTGATGATTTTTGGCTT
CC5		GCACCAGGGATTAGACTAGGGTATCATTTTGATGATTTTTGGCTT
CJ5		GCACCAGGGATTAGACTTGGTTATCATTTTGACGATTTTTGGCTT
CJ6		GCACCAGGGATTACACTTGGTTATCATTTTGACGATTTTTGGCTT
CJ9		GCACCAGGGATTAGACTTGGTTATCATTTTGACGATTTTTGGCTT
CJ10		GCACCAGGGATTAGACTAGGGTATCATTTTGATGATTTTTGGCTT

CC1	GATCAATTAGA	ACTAGGTTTAGAATATTACTCGGATGTAAAATATACAAATTC
CC2	GATCAATTAGA	ACTAGGTTTAGAATATTACTCGGATGTAAAATATACAAATTC
CC3	GATCAATTAGA	ACTAGGTTTAGAACATTACTCGGATGTAAAATATACAAATTC
CC4	GATCAATTAGA	ACTAGGTTTAGAACATTACTCGGATGTAAAATATACAAATTC
CC5	GATCAATTAGA	ACTAGGTTTAGAATATTACTCGGATGTAAAATATACAAATTC
CJ5	GATCAATTAGA	ATTTGGGTTAGAGCATTATTCTGATGTTAAATATACAAAAA

CJ6 GATCAATTAGAATTTGGGTTAGAGCATTATTCTGATGTTAAATATACAAATAC
CJ9 GATCAATTAGAATTTGGGTTAGAGCATTATTCTGATGTTAAATATACAAATAC
CJ10 GATCAATTAGAACTAGGTTTAGAACATTACTCGGATGTAAAATATACAAATTC

CC1 TACTCTTACCACCGATATTACTAGAACTTATTTGAGTGCTATTAAAGGCATTG
CC2 TACTCTTACCACCGATATTACTAGAACTTATTTGAGTGCTNTTAAAGGCATTG
CC3 TACTCTTACCACCGATATTACTAGAACTTATTTGAGTGCTATTAAAGGCATTG
CC4 TACTCTTACCACCGATATTACTAGAACTTATTTGAGTGCTATTCAAGGCATTG
CC5 TACTCTTACCACCGATATTACTAGAACTTATTTGAGTGCTATTAAAGGCATTG
CJ5 ATACAAATCTACAGATATTACAAGAACTTATTTGAGTGCTATTAAAGGTATTG
CJ6 AAATAAAACTACAGATATTACAAGAACTTATTTGAGTGCTATTAAAGGTATTG
CJ9 AAATAAAACTACAGATATTACAAGAACTTATTTGAGTGCTATTAAAGGTATTG
CJ10 TACTCTTACCACCGATATTACTAGAACTTATTTGAGTGCTATTAAAGGCATTG

CC1 ATTTAGGTGAGAAATTTTATTTTTATGGTTTAGCTGGTGTGGGATATGAGGAT
CC2 ATTTAGGTGAGAAATTTTATTTTTATGGTTTAGCTGGNGTGGGATATGAGGAT
CC3 ATTTAGGTGAGAAATTTTATTTTTATGGTTTAGCTGGTGTGGGATATGAGGAT
CC4 ATTTAGGTGAGAAATTTTATTTTTATGGTTTAGCTGGTGTGGGATATGAGGAT
CC5 ATTTAGGTGAGAAATTTTATTTTTATGGTTTAGCTGGTGTGGGATATGAGGAT
CJ5 ATGTAGGTGAGAAATTTTATTTCTATGGTTTAGCAGGTGGAGGATATGAGGAT
CJ6 ATGTAGGTGAGAAATTTTATTTCTATGGTTTAGCAGGTGGAGGATATGAGGAT
CJ9 ATGTGGGTGAGAAATTTTATTTCTATGGTTTAGCAGGTGGAGGATATGAAGAT
CJ10 ATTTAGGTGAGAAATTTTATTTTTATGGTTTAGCTGGTGTGGGATATGAGGAT

CC1 TTTTCTAAAGGCGCTTTTGATAATAAAAGTGGAGGATTTGGCCATTATGGAGC
CC2 TTTTCTAAAGGCGCTTTTGATAATAAAAGTGGAGGATTTGGCCATTATGGAGC
CC3 TTTTCTAAAGGCGCTTTTGATAATAAAAGTGGAGGATTTGGCCATTATGGAGC
CC4 TTTTCTAAAGGCGCTTTTGATAATAAAAGTGGAGGATTTGGCCATTATGGAGC
CC5 TTTTCTAAAGGCGCTTTTGATAATAAAAGTGGAGGATTTGGCCATTATGGAGC
CJ5 TTTTCAAATGCTGCTTATGATAATAAAAGCGGTGGATTTGGACATTATGGCGC
CJ6 TTTTCAAATGCTGCTTATGATAATAAAAGCGGTGGATTTGGACATTATGGCGC
CJ9 TTTTCAAATGCTGCTTATGATAATAAAAGCGGTGGATTTGGACATTATGGCGC
CJ10 TTTTCTAAAGGCGCTTTTGATAATAAAAGTGGAGGATTTGGCCATTATGGAGC

CC1 AGGTTTAAAATTTTCGCCTTAGTGATTCTTTAGCTTTAAGACTTGAAACAAGAG
CC2 AGGTTTAAAATTTTCGCCTTACTGATTCTTTAGCTTTAAGACTTGAAACAAGAG
CC3 AGGTTTAAAATTTTCGCCTTAGTGATTCTTTAGCTTTAAGACTTGAAACAAGAG
CC4 AGGTTTAAAATTTTCGCCTTAGTGATTCTTTAGCTTTAAGACTTGAAACAAGAG
CC5 AGGTTTAAAATTTTCGCCTTAGTGATTCTTTAGCTTTAAGACTTGAAACAAGAG
CJ5 GGGTGTA AAAATTCGGTCTTAGTGATTCTTTGGCTTTAAGACTTGAAACTAGAG
CJ6 GGGTGTA AAAATTCGGTCTTAGTGATTCTTTGGCTTTAAGACTTGAAACTAGAG
CJ9 GGGTGTA AAAATTCGGTCTTAGTGATTCTTTGGCTTTAAGACTTGAAACTAGAG
CJ10 AGGTTTAAAATTTTCGCCTTAGTGATTCTTTAGCTTTAAGACTTGAAACAAGAG

CC1 ATCAAATTTCTTTCCATGATGCAGATCATAGTTGGGTTTCAACTTTAGGTATT
CC2 ATCAAATTTCTTTCCATGATGCAGATCATAGTTGGGTTTCAACTTTAA
CC3 ATCAAATTTCTTTCCATGATGCAGATCATAGTTGGGTTTCAACTTTAGGTATT
CC4 ATCAAATTTCTTTCCATGATGCAGATCATAGTTGGGTTTCAACTTTAGGTATT

CC5 ATCAAATTTCTTTCCATGATGCAGATCATAGTTGGGTTTCAACTTTAGGTATT
 CJ5 ATCAAATTATCAAATTAATTTCAATCATGCAAACCATAATTGGGTTTCAACTT
 CJ6 ATCAAATTAATTTCAATCATGCAAACCATAATTGGGTTTCAACTTTAGGTATT
 CJ9 ATCAAATTAATTTTAATCATGCAAACCATAATTGGGTTTCAACTTTAGGTATT

2) *CadF* gene 단백질 서열 분석

단백질 서열 분석 결과 아래 그림과 같이 일부의 아미노산이 다를 수 있었다. 이에 단클론 항체를 제조할 경우, 이러한 변이 서열은 피하도록하고 conserve 되어있는 서열에 중점을 두어 제조하도록 하였다.

CC1 APGIRLGYHF DDFWLDQLE LGLEYYSQVY YTNSTLTDDI TRTYLSAIKGI
 CC2 APGIRLGYHF DDFWLDQLE LGLEYYSQVY YTNSTLTDDI TRTYLSAIKGI
 CC3 APGIRLGYHF DDFWLDQLE LGLEHYSDVK YTNSTLTDDI TRTYLSAIKGI
 CC4 APGIRLGYHF DDFWLDQLE LGLEHYSDVK YTNSTLTDDI TRTYLSAIQGI
 CC5 APGIRLGYHF DDFWLDQLE LGLEYYSQVY YTNSTLTDDI TRTYLSAIKGI
 CJ5 APGIRLGYHF DDFWLDQLE FGLEHYSDVK YTN~~TNK~~TDDI TRTYLSAIKGI
 CJ6 APGITLGYHF DDFWLDQLE FGLEHYSDVK YTN~~TNK~~TDDI TRTYLSAIKGI
 CJ9 APGIRLGYHF DDFWLDQLE LGLEHYSDVK YTNSTLTDDI TRTYLSAIKGI
 CJ10 APGIRLGYHF DDFWLDQLE LGLEHYSDVK YTNSTLTDDI TRTYLSAIKGI

CC1 DLGKGFYFYGL AGVGYEDFSK GAFDNKRGGF GHYGAGLKFR LTDSLALRLE
 CC2 DLGKGFYFYGL AGVGYEDFSK GAFDNKRGGF GHYGAGLKFR LTDSLALRLE
 CC3 DLGKGFYFYGL AGVGYEDFSK GAFDNKSGGF GHYGAGLKFR LSDSLALRLE
 CC4 DLGKGFYFYGL AGVGYEDFSK GAFDNKSGGF GHYGAGLKFR LSDSLALRLE
 CC5 DLGKGFYFYGL AGVGYEDFSK GAFDNKSGGF GHYGAGLKFR LSDSLALRLE
 CJ5 DVGKGFYFYGL AGGGYEDFSN AAYDNKSGGF GHYGAGVKFR LSDSLALRLE
 CJ6 DVGKGFYFYGL AGGGYEDFSN AAYDNKSGGF GHYGAGVKFR LSDSLALRLE
 CJ9 DLGKGFYFYGL AGVGYEDFSK GAFDNKSGGF GHYGAGLKFR LSDSLALRLE
 CJ10 DLGKGFYFYGL AGVGYEDFSK GAFDNKSGGF GHYGAGLKFR LSDSLALRLE

CC1 TRDQISFHD ADHSWVSTL
 CC2 TRDQISFHD ADHSWVSTL
 CC3 TRDQISFHD ADHSWVSTL GIRS
 CC4 TRDQISFHD ADHSWVSTL GIRS
 CC5 TRDQISFHD ADHSWVSTL GIRVE
 CJ5 TRDQINFNH ANHNWVSTL GIRS
 CJ6 TRDQINFNH ANHNWVSTL GIRC
 CJ9 TRDQISFHD ADHSWVSTL GIRS
 CJ10 TRDQISFHD ADHSWVSTL GIRVE

마. *Campylobacter* 균주 특성 파악

1) PFGE를 이용한 임상균주 및 축산물 분리균주의 비교분석

SM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 SM

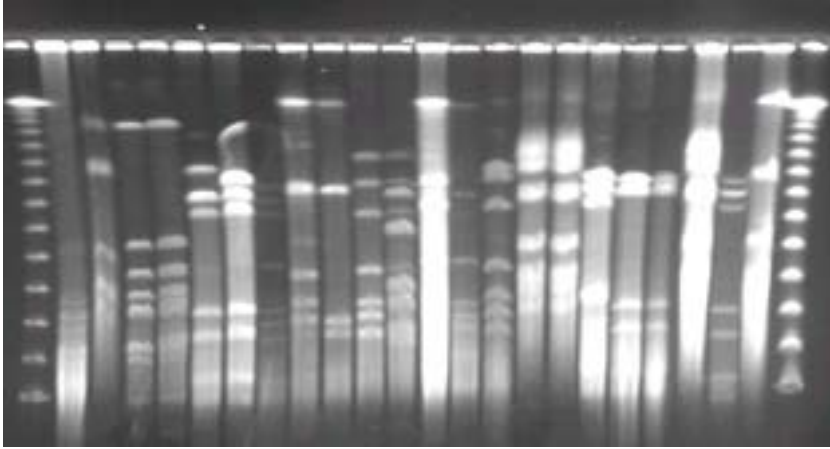


Figure 5. PFGE pattern for *Campylobacter jejuni* 1 ~ 23

SM : Mid Range PFG Marker (BioLabs), Lane 1 : *C. jejuni* 1, Lane 2 : *C. jejuni* 2, Lane 3 : *C. jejuni* 3, Lane 4 : *C. jejuni* 4, Lane 5 : *C. jejuni* 5, Lane 6 : *C. jejuni* 7, Lane 7 : *C. jejuni* 8, Lane 8 : *C. jejuni* 9, Lane 9 : *C. jejuni* 10, Lane 10 : *C. jejuni* 11, Lane 11 : *C. jejuni* 12, Lane 12 : *C. jejuni* 13, Lane 13 : *C. jejuni* 14, Lane 14 : *C. jejuni* 15, Lane 15 : *C. jejuni* 16, Lane 16 : *C. jejuni* 17, Lane 17 : *C. jejuni* 18, Lane 18 : *C. jejuni* 19, Lane 19 : *C. jejuni* 20, Lane 20 : *C. jejuni* 21, Lane 21 : *C. jejuni* 22, Lane 22 : *C. jejuni* 23

SM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 SM

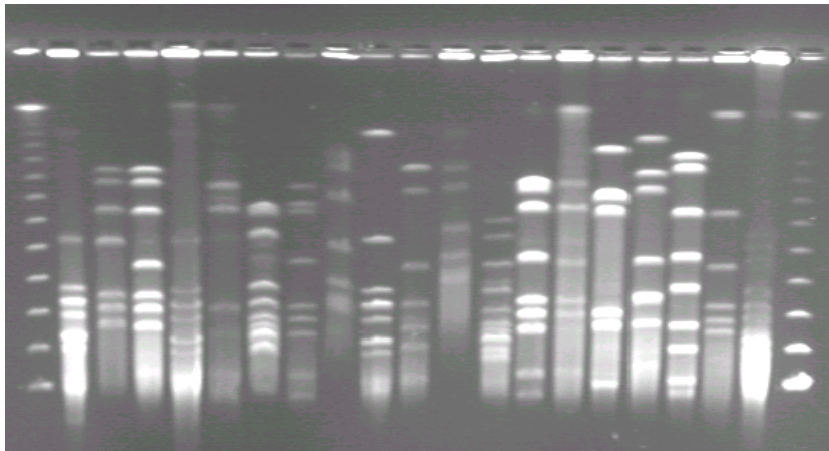


Figure 6. PFGE pattern for *Campylobacter jejuni* 25 ~ 45

SM : Mid Range PFG Marker (BioLabs), Lane 1 : *C. jejuni* 25, Lane 2 : *C. jejuni* 26, Lane 3 : *C. jejuni* 27, Lane 4 : *C. jejuni* 28, Lane 5 : *C. jejuni* 29, Lane 6 : *C. jejuni* 30, Lane 7 : *C. jejuni* 31, Lane 8 : *C. jejuni* 32, Lane 9 : *C. jejuni* 33, Lane 10 : *C. jejuni* 34, Lane 11 : *C. jejuni* 35, Lane 12 : *C. jejuni* 36, Lane 13 : *C. jejuni* 37, Lane 14 : *C. jejuni* 38, Lane 15 : *C. jejuni* 39, Lane 16 : *C. jejuni* 41, Lane 17 : *C. jejuni* 42, Lane 18 : *C. jejuni* 43, Lane 19 : *C. jejuni* 44, Lane 20 : *C. jejuni* 45

SM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 SM

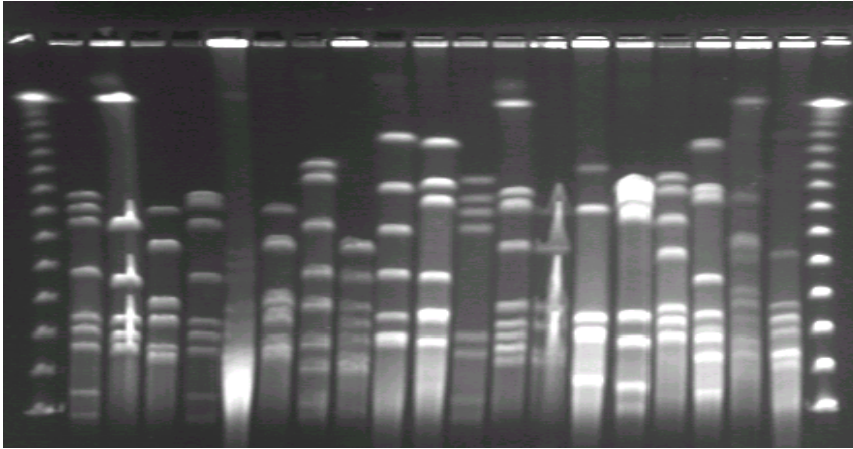


Figure 7. PFGE pattern for *Campylobacter jejuni* 47 ~ 68

SM : Mid Range PFG Marker (BioLabs), Lane 1 : *C. jejuni* 47, Lane 2 : *C. jejuni* 48, Lane 3 : *C. jejuni* 49, Lane 4 : *C. jejuni* 50, Lane 5 : *C. jejuni* 51, Lane 6 : *C. jejuni* 52, Lane 7 : *C. jejuni* 53, Lane 8 : *C. jejuni* 54, Lane 9 : *C. jejuni* 56, Lane 10 : *C. jejuni* 57, Lane 11 : *C. jejuni* 58, Lane 12 : *C. jejuni* 60, Lane 13 : *C. jejuni* 61, Lane 14 : *C. jejuni* 62, Lane 15 : *C. jejuni* 63, Lane 16 : *C. jejuni* 65, Lane 17 : *C. jejuni* 66, Lane 18 : *C. jejuni* 67, Lane 19 : *C. jejuni* 68

SM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 SM

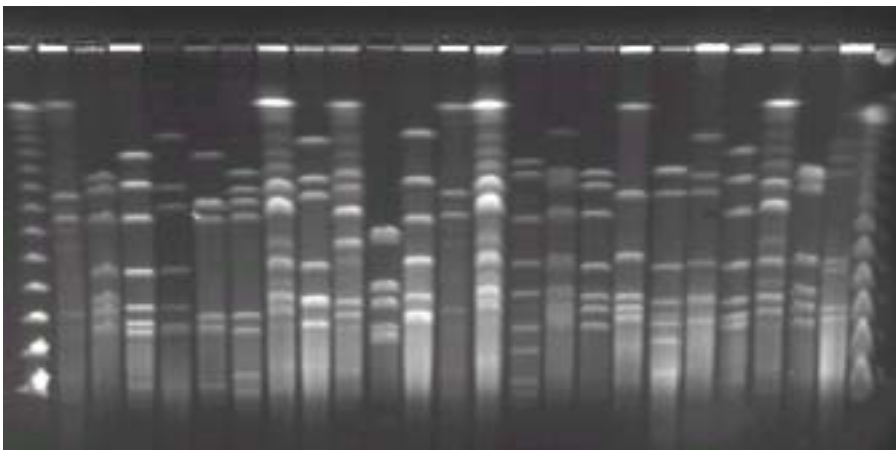


Figure 8. PFGE pattern for *Campylobacter jejuni* 69 ~ 91

SM : Mid Range PFG Marker (BioLabs), Lane 1 : *C. jejuni* 69, Lane 2 : *C. jejuni* 70, Lane 3 : *C. jejuni* 71, Lane 4 : *C. jejuni* 72, Lane 5 : *C. jejuni* 73, Lane 6 : *C. jejuni* 74, Lane 7 : *C. jejuni* 75, Lane 8 : *C. jejuni* 76, Lane 9 : *C. jejuni* 77, Lane 10 : *C. jejuni* 78, Lane 11 : *C. jejuni* 79, Lane 12 : *C. jejuni* 80, Lane 13 : *C. jejuni* 81, Lane 14 : *C. jejuni* 82, Lane 15 : *C. jejuni* 83, Lane 16 : *C. jejuni* 84, Lane 17 : *C. jejuni* 85, Lane 18 : *C. jejuni* 86, Lane 19 : *C. jejuni* 87, Lane 20 : *C. jejuni* 88, Lane 21 : *C. jejuni* 89, Lane 22 : *C. jejuni* 90, Lane 23 : *C. jejuni* 91

SM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 SM

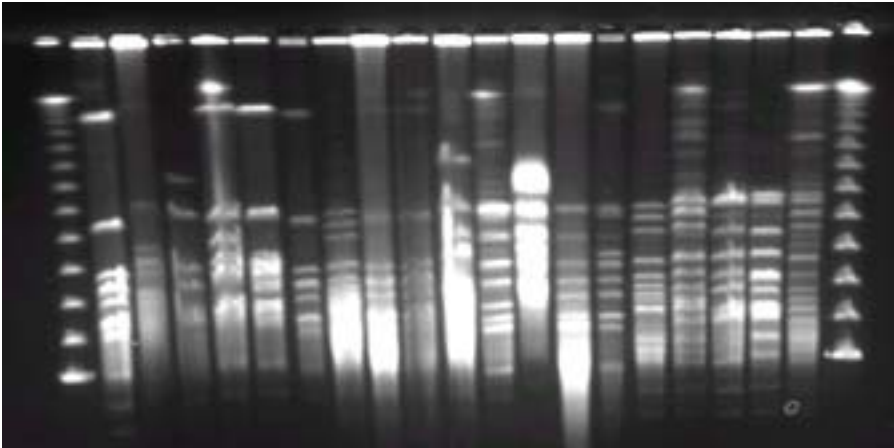


Figure 9. PFGE pattern for *Campylobacter coli* 1 ~ 20

SM : Mid Range PFG Marker (BioLabs), Lane 1 : *C. coli* 1, Lane 2 : *C. coli* 2, Lane 3 : *C. coli* 3, Lane 4 : *C. coli* 4, Lane 5 : *C. coli* 5, Lane 6 : *C. coli* 6, Lane 7 : *C. coli* 7, Lane 8 : *C. coli* 8, Lane 9 : *C. coli* 9, Lane 10 : *C. coli* 10, Lane 11 : *C. coli* 11, Lane 12 : *C. coli* 12, Lane 13 : *C. coli* 13, Lane 14 : *C. coli* 15, Lane 15 : *C. coli* 16, Lane 16 : *C. coli* 17, Lane 17 : *C. coli* 18, Lane 18 : *C. coli* 19, Lane 19 : *C. coli* 20

SM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 SM

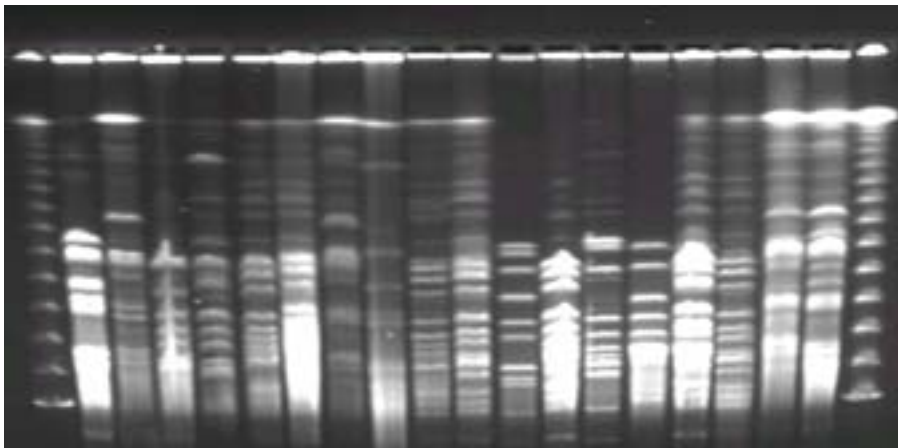


Figure 10. PFGE pattern for *Campylobacter coli* 21 ~ 39

SM : Mid Range PFG Marker (BioLabs), Lane 1 : *C. coli* 21, Lane 2 : *C. coli* 22, Lane 3 : *C. coli* 23, Lane 4 : *C. coli* 25, Lane 5 : *C. coli* 26, Lane 6 : *C. coli* 27, Lane 7 : *C. coli* 28, Lane 8 : *C. coli* 29, Lane 9 : *C. coli* 30, Lane 10 : *C. coli* 31, Lane 11 : *C. coli* 32, Lane 12 : *C. coli* 33, Lane 13 : *C. coli* 34, Lane 14 : *C. coli* 35, Lane 15 : *C. coli* 36, Lane 16 : *C. coli* 37, Lane 17 : *C. coli* 38, Lane 18 : *C. coli* 39

SM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 S
M

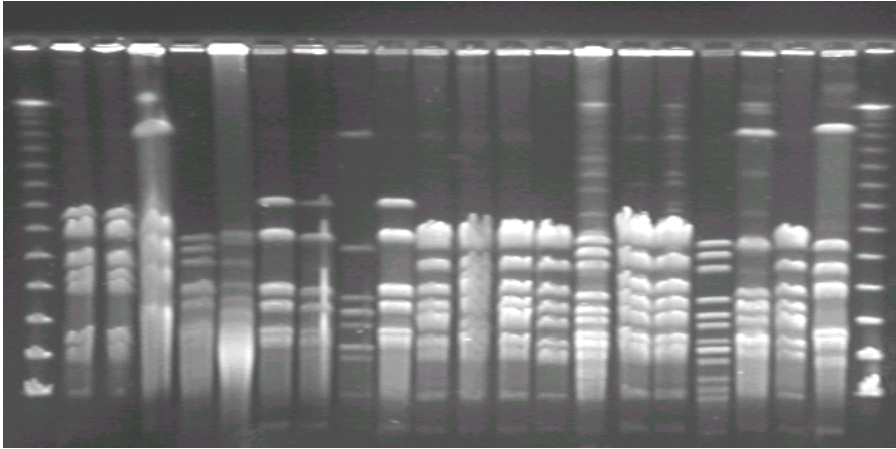


Figure 11. PFGE pattern for *Campylobacter coli* 41 ~ 60

SM : Mid Range PFG Marker (BioLabs), Lane 1 : *C. coli* 41, Lane 2 : *C. coli* 42, Lane 3 : *C. coli* 43, Lane 4 : *C. coli* 44, Lane 5 : *C. coli* 45, Lane 6 : *C. coli* 46, Lane 7 : *C. coli* 47, Lane 8 : *C. coli* 48, Lane 9 : *C. coli* 49, Lane 10 : *C. coli* 50, Lane 11 : *C. coli* 51, Lane 12 : *C. coli* 52, Lane 13 : *C. coli* 53, Lane 14 : *C. coli* 54, Lane 15 : *C. coli* 55, Lane 16 : *C. coli* 56, Lane 17 : *C. coli* 57, Lane 18 : *C. coli* 58, Lane 19 : *C. coli* 59, Lane 20 : *C. coli* 60

SM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 SM

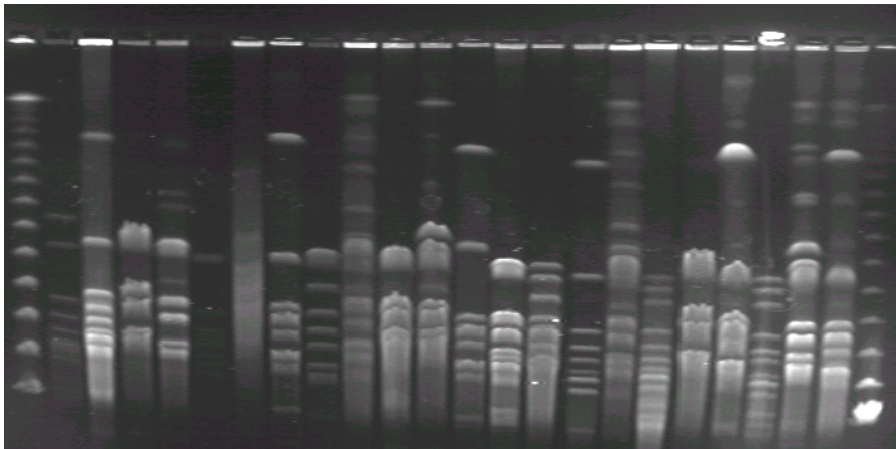


Figure 12. PFGE pattern for *Campylobacter coli* 61 ~ 82

SM : Mid Range PFG Marker (BioLabs), Lane 1 : *C. coli* 61, Lane 2 : *C. coli* 62, Lane 3 : *C. coli* 63, Lane 4 : *C. coli* 64, Lane 5 : *C. coli* 65, Lane 6 : *C. coli* 66, Lane 7 : *C. coli* 67, Lane 8 : *C. coli* 68, Lane 9 : *C. coli* 69, Lane 10 : *C. coli* 70, Lane 11 : *C. coli* 71, Lane 12 : *C. coli* 72, Lane 13 : *C. coli* 73, Lane 14 : *C. coli* 74, Lane 15 : *C. coli* 75, Lane 16 : *C. coli* 76, Lane 17 : *C. coli* 77, Lane 18 : *C. coli* 78, Lane 19 : *C. coli* 79, Lane 20 : *C. coli* 80, Lane 21 : *C. coli* 81, Lane 22 : *C. coli* 82

SM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 SM

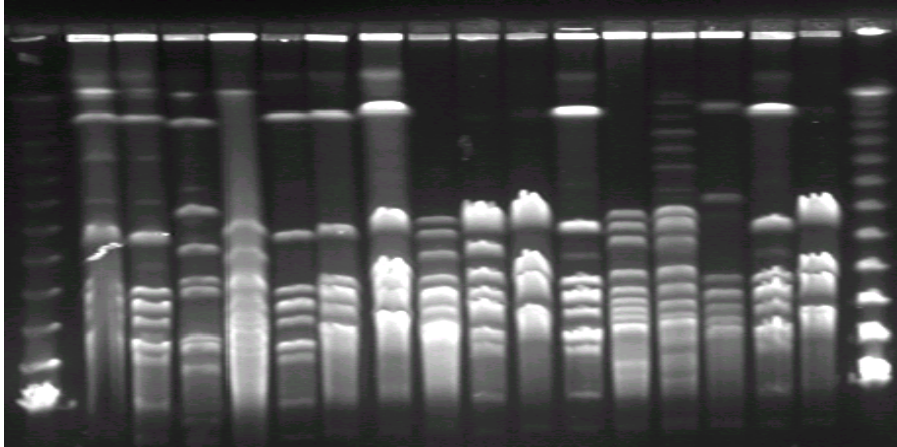


Figure 13. PFGE pattern for *Campylobacter coli* 83 ~ 103

SM : Mid Range PFG Marker (BioLabs), Lane 1 : *C. coli* 83, Lane 2 : *C. coli* 84, Lane 3 : *C. coli* 85, Lane 4 : *C. coli* 86, Lane 5 : *C. coli* 87, Lane 6 : *C. coli* 89, Lane 7 : *C. coli* 90, Lane 8 : *C. coli* 91, Lane 9 : *C. coli* 93, Lane 10 : *C. coli* 94, Lane 11 : *C. coli* 95, Lane 12 : *C. coli* 96, Lane 13 : *C. coli* 97, Lane 14 : *C. coli* 98, Lane 15 : *C. coli* 102, Lane 16 : *C. coli* 103

SM 1 2 3 4 5 SM 6 7 8 9 10 11 12 13

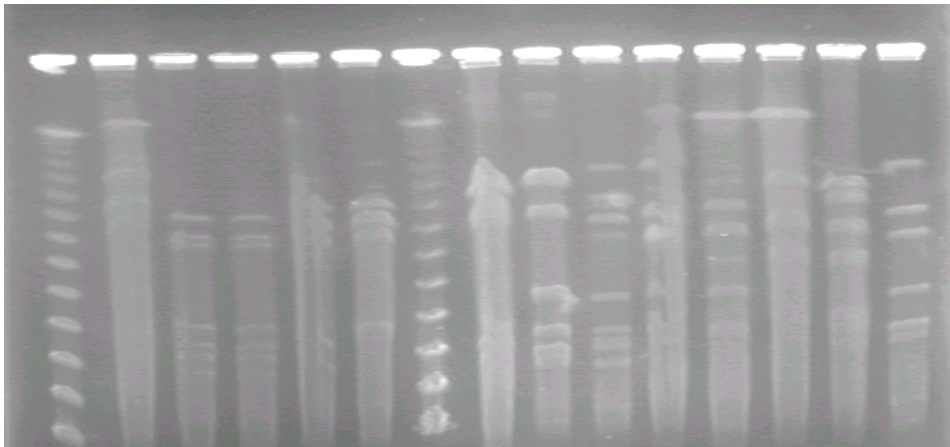


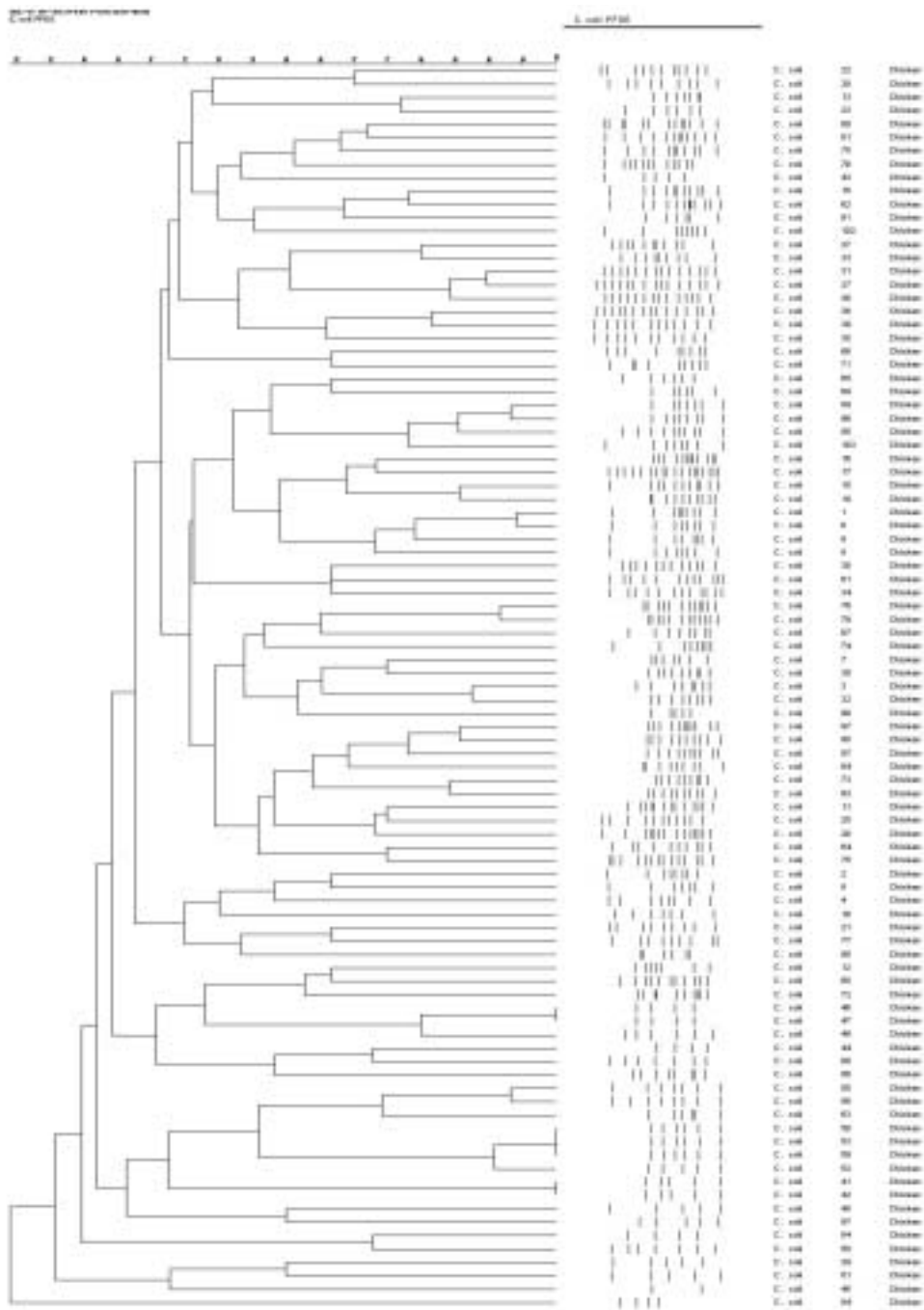
Figure 14. PFGE pattern for *Campylobacter jejuni* 임상균주

SM : Mid Range PFG Marker (BioLabs), Lane 1 : *C. jejuni* 임상균주 1, Lane 2 : *C. jejuni* 임상균주 2, Lane 3 : *C. jejuni* 임상균주 3, Lane 4 : *C. jejuni* 임상균주 4, Lane 5 : *C. jejuni* 임상균주 5, Lane 6 : *C. jejuni* 임상균주 6, Lane 7 : *C. jejuni* 임상균주 7, Lane 8 : *C. jejuni* 임상균주 8, Lane 9 : *C. jejuni* 임상균주 9, Lane 10 : *C. jejuni* 임상균주 10, Lane 11 : *C. jejuni* 임상균주 11, Lane 12 : *C. jejuni* 임상균주 12, Lane 13 : *C. jejuni* 임상균주 13

2) PFGE 결과 분석

2003년도 분리한 축산분리 균주와 임상분리균주 등 *Campylobacter* 207균주를 SmaI 효소로 처리한 다음 PFGE pattern을 Gel Compar II으로 확인하였다. SmaI 효소는 40kb에서 400kb까지 5개에서 15개 정도의 다양한 band를 형성하였다. 104개의 *C. jejuni* 균주와 103개의 *C. coli*균주는 각각 12type (A to L)과 15 type(A to N)의 pattern을 나타내었다.

*C. jejuni*는 Type E(104개 중 34개)이 가장 많은 패턴을 보였으며, Type F에서는 닭에서 분리한 축산균주와 사람의설사증환자의 분변에서 분리한 임상균주와의 유사성이 70%에 달하는 것으로 나타났다. 하지만 다른 축산균주들은 서로 55%내외의 유사성을 나타나고 있어 서로 연관성이 적은 것으로 나타나 키트개발시 좀더 다양한 균주들을 대상으로 효율적인 유효성평가를 할 수 있을 것으로 사료된다.



(b) *Campylobacter coli* PFGE dendrogram

Figure 15. PFGE dendrogram

제 2 절. *Campylobacter* 진단 kit에 대한 사용자 설문조사

1. 설문조사방법

- o 구조화된 설문지를 통한 일대일 개별 면접으로 2004. 10월부터 2005년 3월까지 전국에 걸쳐 국·공립연구소, 학교, 병원, 기업체등을 대상으로 총 269곳을 대상으로 설문조사를 실시하였다.

Table 8. 설문 조사 방법

분 류	내 용
자료수집 방법	- 구조화된 설문지를 통한 일대일 개별 면접
자료수집 기간	- 2004. 10 ~ 2005. 3
조사 지역	- 전국
조사 대상	- 국·공립연구소, 학교, 병원, 기업체
표본 수	- 총 269곳
신뢰수준	- 95% ± 5%

가. 설문응답자 인적사항

1) 설문자의 특성

- 가) 응답자의 근무지로 학교가 39.0%(105명)로 가장 많았으며, 다음으로 국·공립연구소가 24.6%(66명), 기업체가 19.0%(51명), 병원이 17.4%(47명) 순으로 나타났다.

나) 응답자의 지역은 서울이 32.7%(88명)로 가장 많았음. 뒤로 경기(인천)이 26.8%(72명)로 많은 비율을 차지하였으며, 다음으로 경북(대구, 울산)이 10.0%(27명), 충남(대전)이 7.1%(19명), 전남(광주)이 5.9%(16명)이었다. 경남(부산)과 강원은 5.2%(14명)로 같았으며, 이어서 전북(전주)이 3.7%(10명), 충북이 3.0%(8명), 제주가 0.4%(1명) 순이었다.

Table 9. 설문자의 특성

설문자 특성		건수(명)	비율(%)
근무처	국·공립연구소	66	24.6
	학교	105	39.0
	병원	47	17.4
	기업체	51	19.0
	합계	269	100.0
지역	서울	88	32.7
	경기, 인천	72	26.8
	강원	14	5.2
	충남(대전)	19	7.1
	충북	8	3.0
	경남(부산)	14	5.2
	경북(대구, 울산)	27	10.0
	전남(광주)	16	5.9
	전북(전주)	10	3.7
	제주	1	0.4
	합계	269	100.0

2. 설문 조사 결과

가. 축산물 안전확보를 위한 *Campylobacter* 진단 kit 개발 관련 설문조사

1) 병원성 *Campylobacter*의 특성 인지 정도

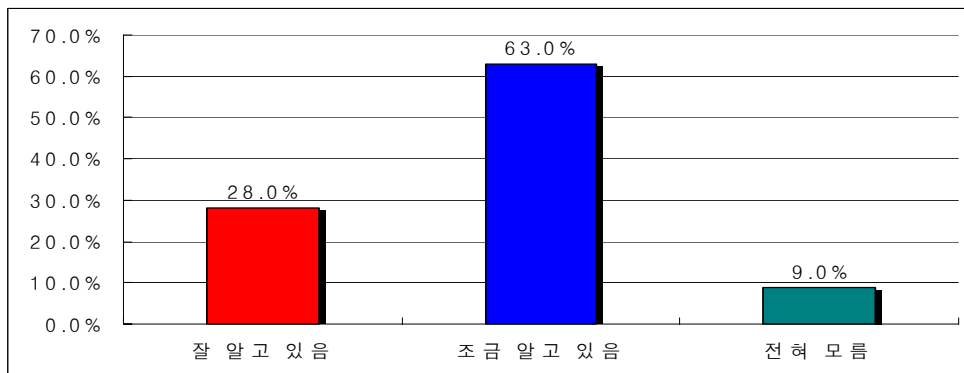
- 평소 병원성 *Campylobacter*의 특성에 대해 알고 있었는가에 대한 응답으로 “조금 알고 있음”이 63.0%(169명)으로 가장 많았으며, “잘 알고 있음” 28.0%(75명), “전혀 모름” 9.0%(24명)순으로 나타났다.
- ➔ 28%에 해당하는 응답자가 잘 알고 있다고 응답하였으며, 63%는 조금 알고 있고, 9%에 해당하는 24명은 전혀 모르는 것으로 파악되어 각 계의 연구관계자 91%는 *Campylobacter*에 대한 인식이 있는 것으로 판단된다.(Table 10, Figure 16)

Table 10. 병원성세균 인지정도

(건수 : 268건)

구분	잘 알고 있음	조금 알고 있음	전혀 모름
비율 (건수)	28.0% (75)	63.0% (169)	9.0% (24)

Figure 16. 병원성세균 인지정도



2) 병원성 *Campylobacter*의 주 원인균 인지 정도

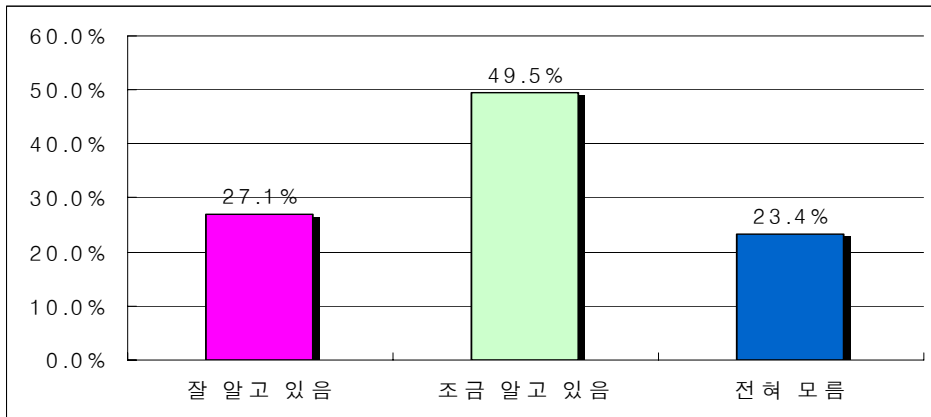
- 병원성 *Campylobacter*이 최근 미국, 일본, 영국 등에서 식중독을 가장 많이 발생시키는 주 원인균이라는 것을 알고 있었는가에 대한 응답으로 “조금 알고 있음”이 49.5%(133명)으로 가장 많았다.. 그리고 “잘 알고 있음”이 27.1%(73명), “전혀 모름”이 23.4%(63명) 순이었다.

➡ 선진 외국에서의 식중독을 가장 많이 일으키는 세균이라는 사실은 76.6%에 해당하는 응답자가 인식을 하고 있는 것으로 나타나 *Campylobacter*의 양상 및 증상 등 비교적 많은 응답자가 인식하고 있는 것으로 나타났으나, 23.4%(63명)에 해당하는 응답자는 전혀 모른다고 응답하여 일부의 연구자들에게는 잘 알려져 있지 않은 세균으로 인식되었다. (Table 11, Figure 17)

Table 11. 주 원인균 인지정도 (건수 : 269건)

구분	잘 알고 있음	조금 알고 있음	전혀 모름
비율 (건수)	27.1% (73)	49.5% (133)	23.4% (63)

Figure 17. 주 원인균 인지정도



3) 위생상 문제가 된다고 생각하는 식품의 우선순위

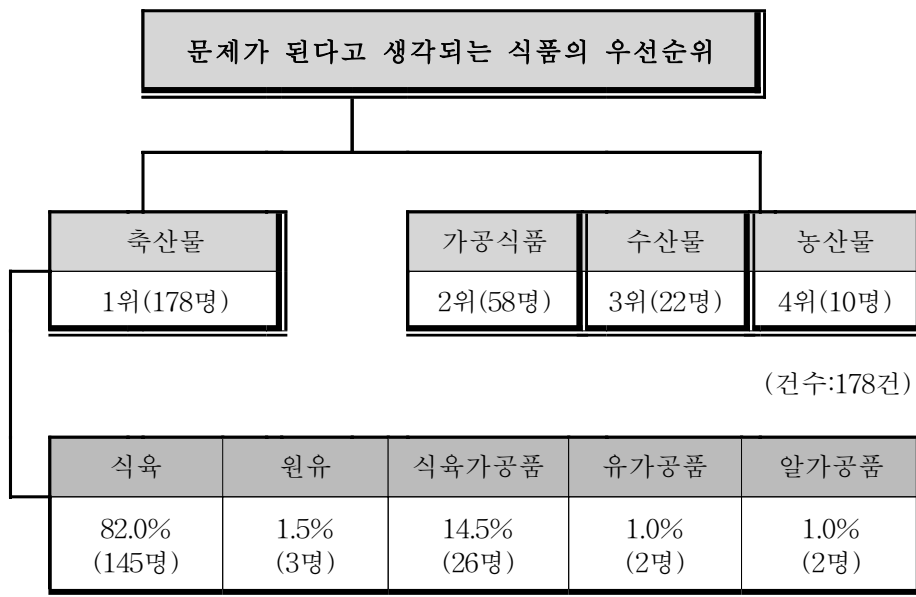
가) 병원성 *Campylobacter*이 위생상 문제가 된다고 생각하는 식품을 우선순위로 응답한 결과, 전체 268명의 응답자 중에 “축산물”이 178명으로 가장 많았으며, “가공식품”이 58명, “수산물”이 22명, “농산물”이 10명 순으로 나타났다.

나) 축산물을 1순위라고 하신 분 중 어떤 품목이 가장 문제가 된다고 생각하냐는 질문에 1순위를 선택한 178명 중의 “식육(닭고기, 쇠고기 등)”을 선택한 사람은 82.0%(145명)으로 가장 많은 비율을 차지하였다. 그 다음으로 “식육가공품(햄, 소시지 등)”을 선택한 사람이 14.6%(26명)으로 많았으며, “원유(우유 등)”는 1.5%(3명),

“유가공품(치즈, 버터 등)”은 1.0%(2명), “알가공품(계란, 메추리알 등)”은 1.0%(2명) 순이었다.

- ➔ 질문 대답자(178명) 중 응답자의 82%에 해당하는 145명이 식육(닭고기, 쇠고기, 돼지고기 등)이 식중독의 주요 원인이라는 응답을 하여 식육에 대하여 식중독 및 세균감염에 대한 주요한 문제라는 것을 인식하는 것으로 판단되며, 그다음으로는 식육가공품으로 주로 식육에 관련된 것이 식중독의 주요 원인으로 생각하고 있다. (Figure 18)

Figure 18. 문제가 된다고 생각되는 식품의 우선순위 (건수 : 268건)



4) 병원성 *Campylobacter* 분리·확인시험

- 병원성 *Campylobacter* 분리·확인시험을 하였는가라는 질문에 대한 응답 중 “한번도 시험해 본 적이 없다.”가 68.0%(183명)으로 많은 사람들이 병원성세균 분리·확인시험을 해보지 않았다. 그 다음으로 “가끔 시험하고 있다.”가 13.8%(37명), “1~2회 시험해 본 적이 있다.”가 13.0%(35명), “항상 시험 하고 있다.”가 3.0%(8명) 순으로 나타났다.(Table 12)

Table 12. 병원성세균 분리·확인시험

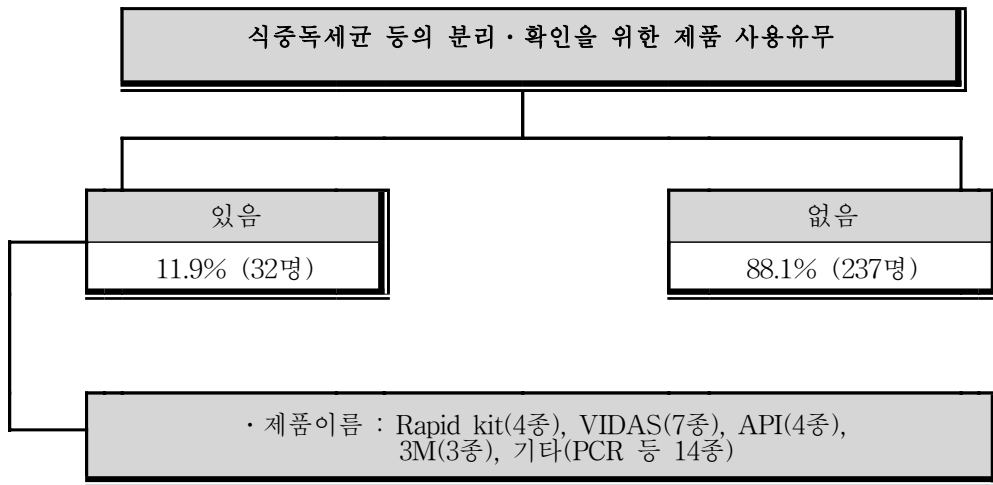
(건수 : 269건)

구분	항상 시험하고 있음	가끔 시험하고 있음	1~2회 시험해본 적 있음	한번도 시험해본 적 없음	기타
비율 (건수)	3.0% (8)	13.8% (37)	13.0% (35)	68.0% (183)	2.3% (6)

5) 식중독세균 등의 분리·확인을 위한 제품 사용유무

- 식중독세균 등의 분리·확인을 위해 간편하게 검출할 수 있는 기준에 개발된 제품을 사용해본 적이 있느냐의 설문에 “없다”는 응답이 88.1%(237명) 나왔다. 이는 “있다”는 응답을 한 11.9%(32명)보다 7배 이상의 응답으로 대다수의 사람들이 사용한 경험이 없었다. (Figure 19)

Figure 19. 식중독 세균 등의 분리·확인을 위한 제품 사용 유무 (건수 : 269건)



6) 국내에서 개발될 병원성 *Campylobacter* 검출 키트의 사용 의향

- 특이도와 민감도가 외국제품과 비교시 탁월한 성능을 가지고 있으며, 간단히 분리·확인할 수 있는 병원성 *Campylobacter* 검출 키트가 국내에서 개발된다면 향후 검사에 사용하실 의향에 대한 설문 응답으로 “가끔 사용할 것임”이 58.3%(154명)으로 가장 많았으며, 그 다음으로 “항상 사용할 것임”이 30.3%(80명), “사용 하지 않을 것임” 6.1%(16명), 기타 5.3%(14명) 순이었다. (Table 13, Figure 20)

■ 참고

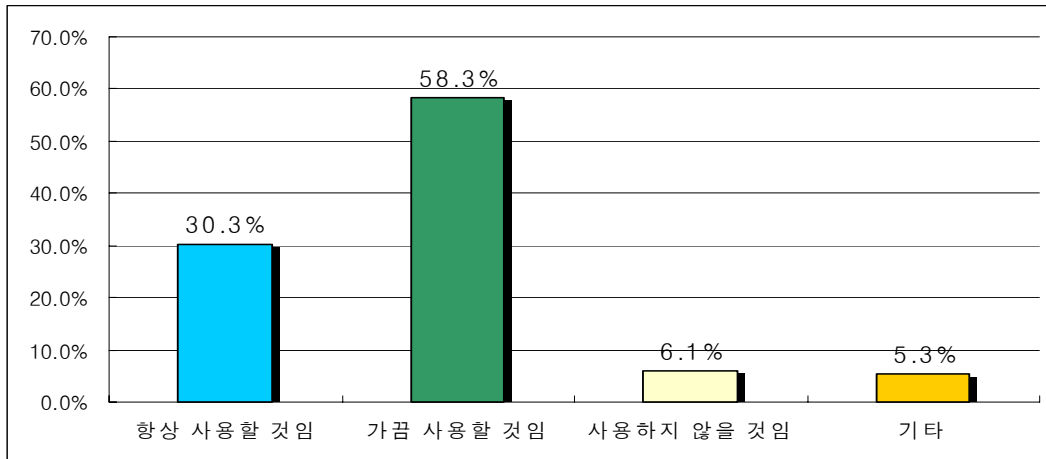
구분	분리·동정(AOAC방법)	키트사용
접종·분리·확인에 걸리는 소요 시간	7일	30~40분
재료비 추정 비용 및 시험장비	3만~4만원 추정/시료1점 (미호기적 조건 배양기 필요함)	3천원 예상/시료1점 (외국수입키트의 1/3가격)(미호기적 조건 배양기 필요없음)

Table 13. 검출 키트의 사용 의향

(건수 : 264건)

구분	항상 사용할 것임	가끔 사용할 것임	사용하지 않을 것임	기타
비율 (건수)	30.3% (80)	58.3% (154)	6.1% (16)	5.3% (14)

Figure 20. 검출 키트의 사용 의향



➔ 응답자의 대부분이 *Campylobacter* 세균에 대한 문제점과 발생현황 등을 인지하여 주요 식중독 세균이라는 인식을 하고 있는 것으로 판단된다. 이에 선진 외국에서 제작되어진 키트보다 더 성능이 좋고, 저렴한 키트가 만들어지게 된다면 사용한다는 응답이 응답자의 88.6%에 해당되어 많은 관심을 가지고 있는 것으로 나타났다.

제 3 절. 병원성 *Campylobacter* 특이항원제조 및 단클론 항체제조

1. 연구방법

가. Outer membrane Protein(37kDa 특이 항원)의 추출

- 1) Bacteria를 원심분리기로 6,000×g에서 침전시킨 후, 4℃에서 PBS로 1회 세척하고 10mM sodium phosphate (pH7.4)에 재부유시켰다.
- 2) 부유액을 얼음에서 5번 sonication 한다. (30초 실시하며, 실시할 때마다 30초씩 냉각기간을 두었다.
- 3) 전체 세포는 6,000×g로 20분간 원심분리함으로써 제거하였다.
- 4) 미정제된 OMP는 100,000×g에서 2시간동안 원심분리함으로써 침전시키고, 10mM Tris(pH7.5)에 재부유시킨 후, sodium *N*-lauryl-sarcosine를 첨가하여 실온에서 30분간 배양시켰다.
- 5) 배양후 부유액을 15℃에서 100,000×g, 2시간동안 원심분리하였다.
- 6) 침전물을 50mM Tris(pH7.5)에 한번 세척후, 재부유하여 -20℃에 보관하였다.

나. 제조항원 및 항체의 특이성 확인

- 1) ELISA를 이용한 항체 특이성 및 민감도 검사
 - 가) ELISA 기법을 이용하여 *Campylobacter* 및 기타 장내세균과의 특이도와 민감도를 검사하고 결과를 토대로 선발된 monoclonal은 balb/c 마우스에 투여하여 복수를 saturated ammonium sulfate로 침전시킨 후 column을 이용하여 정제하고 Ig isotyping을 실시하였다.
- 2) 제조항원의 단백질 특성분석
 - 나) 제조항원의 단백질 특성을 분석하기 위하여 western blot을 실시하였다. 이때 항체로는 생성된 MCA의 배양 상층액 혹은 Freund's incomplete adjuvant 1.5ml을 Balb/c 마우스의 복강에 주입하고 1~2주 후 선발된 clone의 세포를 10⁶ cells/ml 이 되도록 희석한 부유액 0.5ml을 주사하여 획득한 복수를 이용하며, cell protein으로 배양한 *Campylobacter*의 OMP (outer-membrane protein)을 추출하여 이용하였다. 즉, 각 추출물에 대하여 SDS-PAGE에 의해 분리한 후, nitrocellulose membrane에 옮겨 MCA의 배양상층액 혹은 마우스 복수의 상층액으로 blotting을 실시하여 MCA에 대한 항원부위를 확인·규명하였다.

다. 37kDa Omp에 대한 토끼항혈청 생산

- 1) *C. jejuni* 분리균주에서 추출된 Omp를 SDS-PAGE로 분리한 후, Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다.
- 2) 37kDa 단백질 밴드를 gel에서 잘라낸 후, protein electro-elution apparatus (Bio-Rad)를 이용해 정제된 단백질을 분리하였다.
- 3) 100 μ g의 immunogen을 Complete Freund's adjuvant에 혼합하여 female New Zealand White rabbit에 피하주사하였다.
- 4) 4주후에 50 μ g의 immunogen을 incomplete Freund's adjuvant에 혼합하여 추가접종하였다.
- 5) 혈액은 1, 2차 접종전, 2차 접종후 2주후에 채혈하였다.
- 6) 수집된 serum은 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

라. Western blotting을 통한 분리 OMP 항원 특이성 조사 system 확립

- 1) Western blotting은 specific antibody를 이용해 단백질 혼합물 중 원하는 단백질을 찾아내는 방법이다. Protein을 전기영동으로 분리시켜 놓고 이를 nitrocellulose membrane에 transfer시켜 목적하는 단백질 밴드를 면역학적인 방법을 이용해 찾아내는 기법이다.
 - 가) 10⁹ cells/ml 의 농도로 부유된 균체를 sonication(Sonifer B-12, Branson Sonic Power, USA) 시킨 후에 SDS PAGE에 사용하였다.
 - 나) Running gel은 12% acrylamide, 0.4% bisacrylamide, 0.1% SDS 와 375mM Tris-hydrochloride(PH8.8)로 제작되었고 stacking gel은 4% acrylamide, 0.1% bisacrylamide, 0.1% SDS 와 125mM Tris-hydrochloride (PH6.8)로 제작되었다.
 - 다) 50 μ l의 sample을 같은 량의 sample buffer(2%(wt/vol) SDS, 10% saccharose, 5% 2-mercaptoethanol, 62mM Tris(PH6.8), 0.003% phenol red)와 섞어서 60mA per gel의 current로 1시간 30분가량 전기영동을 실시하였다
 - 라) 단백질을 SDS-12.5% PAGE gel에서 분리시킨 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다(100V, 2시간).
 - 마) 전기영동 이후 nitrocellulose membrane을 5% skim milk에 2시간 가량 blocking시켰다.

- 바) Rabbit anti-*C. jejuni* OMP(37kDa) serum in PBS/Tween-20을 1:250으로 희석하여 4°C에서 18시간 동안 membrane과 반응시켰다.
- 사) Membrane을 PBST로 3회 세척하고 HRP conjugated goat anti-rabbit IgG(H+L) (Zymed, USA)를 2000배 희석하여 2시간 반응시켰다
- 아) Membrane을 20분씩 5번 세척하고 ECL solution (Amersham Life Science, USA)을 사용하여 발색하고 Hyperfilm (Amersham Life Science, USA)에 감작시켰다.

마. 항체 정제

- o 토끼에서 생산된 polyclonal Ab로부터 IgG를 정제하기 위하여 protein A antibody purification kit(Sigma)을 사용하였다. 2ml 가량의 혈청을 protein A column에 적용시킨 후, elution buffer를 사용하여 0.5ml씩 tube에 분주하고 항체를 측정하였다.

2. 특이적 단클론 항체의 대량 생산 및 생산 공정 개선 연구

가. 재조합 단백질들의 *E. coli* 에서의 발현 (target protein induction)

- o 각각의 형질전환(transformation)된 *E. coli* 중 하나의 집락 (colony)을 ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 kanamycin (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리된 20 ml LB 액체배지에 접종하고 37°C에서 12시간 동안 배양한다. 배양된 *E. coli*를 새로운 980 ml의 동일 조성의 배지에 접종하고, 파장 600 nm에서 흡광도 값이 0.6일 때, isopropyl-1-thio- β -D-galactoside (IPTG)를 농도가 0.5 mM 되도록 첨가하여 4시간 더 배양한다. 배양된 세포를 5,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 수집하며, 수집된 세포들은 lysis buffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH8.0; 300 mM NaCl; 10 mM imidazole)로 부유시켜 French pressure로 lysis하였다. Lysate들은 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하여 다음 실험에 이용하였다.

나. 재조합단백질의 정제 (purification of recombinant protein)

- 1)수집한 상층액을 0.45 μm syringe filter를 이용하여 유출시킨 후 affinity chromatography 방법을 이용하여 정제하였으며, 이때 Ni Sepharose affinity column

(Amersham phamacia)을 이용하였다. 사용하는 완충액 (buffer)은 아래와 같으며 step gradient elution을 통해 해당 단백질만의 정제를 유도하였다.

가) binding buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH8.0; 300 mM NaCl; 5 mM imidazole)

나) washing buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH8.0; 300 mM NaCl; 20 mM imidazole)

다) elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH8.0; 300 mM NaCl; 250 mM imidazole)

2) 각 단계별로 얻은 시료를 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분석하여 다음 실험에 참고하였다.

다. Western blotting

o 정제된 재조합 단백질들을 SDS-PAGE상에서 전기영동한 후 nitrocellulose membrane (0.45um; Bio-Rad)에 재조합 단백질들을 electrotransfer시켰다. Towbin *et al.* (1979)의 방법으로 transfer후 membrane을 blocking buffer (0.01 M PBS, 3% skim milk)로 실온에서 하룻밤 동안 blocking하고, 양성항원과 음성항원을 blocking solution에 적절한 농도로 희석하여 1시간 30분 동안 실온에서 반응시켰다. 각 반응 단계마다 PBS-Tween 20 (0.05%)으로 3번 씻어내며, peroxidase-conjugated anti-human IgG (Sigma)를 blocking solution에 적당한 농도로 희석하여 2시간 반응시켰다. 신선한 substrate solution (0.5 mg/ml diaminobenzidine; 0.01% hydrogen peroxide; 0.1 M PBS, pH 7.2)을 준비하여 실온에서 1분간 반응시켰다. 반응의 증지를 위하여 증류수를 첨가하며 결과는 육안으로 판독하였다.

라. 단클론 항체 제작용 항원의 준비

o 앞서 준비한 각각의 정제항원들을 KLH 와 OVA에 conjugation한 다음 적당한 양으로 분주하여 항원 투여에 반복적으로 사용하였다. 각기 투여할 항원 단백질의 분량은 다음의 기술 내용과 같다.

가) Cad F1 (16mer): AA 125-140 : FGHYGAGVKFRLSDSL

나) Cad F2 (16mer): AA 131-146 : GVKFRLSDSLALRLET

다) Cad F3 (30mer): AA 117-146 : AYDNKSGGFGHYGA_GVKFRLSDSLALRLET

마. 마우스에 대한 항원 투여 (Antigen boosting)

1) 상기한 바와 같이 확보된 항원을 첫 번째 면역화로서 항원과 동량 (각기 250 μ l 정도

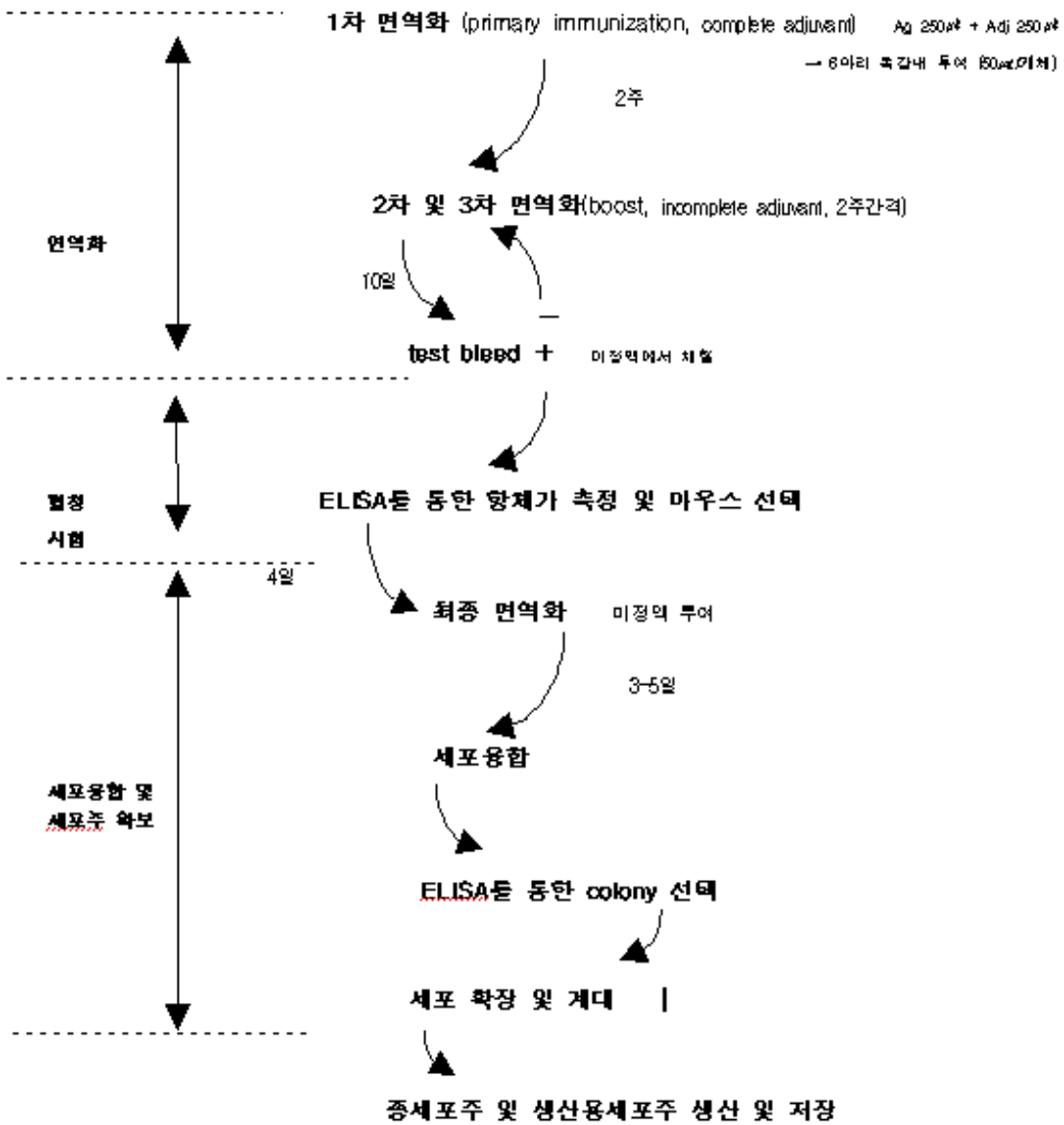
)의 complete Freund's adjuvant (Sigma)를 혼합 후 emulsion을 만들어 생후 6주령의 암컷 BALB/c 마우스의 복강 내 (intraperitoneal injection, ip)에 주입하였다. 1마리당 50 μ g의 항원을 주사하며 6마리를 대상으로 실시하였다. 두 번째 면역화로서 2주 후에 같은 요령으로 주사하였다. 단, incomplete Freund's adjuvant (Sigma)를 사용하며, 항원의 양을 30% 줄인 양 즉, 35 μ g으로 하되 volume은 1차 면역화 때와 동량으로 하였다. 세 번째 면역화 또한 두 번째 면역화 과정과 동일한 방법으로 실시하되, 항원의 양을 25 μ g으로 줄여 투여하였다.



Figure 21. 마우스에 대한 항원의 복강 및 미정맥 투여

2) 그리고 마지막으로 2주 후에 항원(3차 투여 시와 동일한 양)을 PBS에 혼합하여 이를 꼬리의 정맥 (미정맥, intravenous injection, iv)에 주사하였다. 항원의 투여를 거듭할수록 항원의 양을 줄이는 것은 해당 항원에 대한 특이도 높은 B 림프구들의 선택적인 확장을 유도하기 위함이며, 마지막 투여를 미정맥을 통해 하는 것은 특이도 높은 B 림프구들을 비장으로 유도하기 위함이다. 마지막 면역화 후 3일 뒤에 세포융합과정을 거쳤다.

Figure 22. 단클론항체 제조과정 도식



바. 항원 투여 중의 혈청 항체가 검사 (Antibody titering)

- o 3차 면역화 후 4일 뒤에 꼬리 미정맥에서 채혈하여 혈청을 얻은 뒤 1/1000로 인산염 완충액 (PBS, 아래 조성 참고)에 희석하여 효소면역측정법 (ELISA, Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)으로 항체를 결정하였다. 측정된 흡광도 (optical density, O.D)값이 음성대조군의 마우스(항원을 주입하지 않은 쥐의 혈청)의 그것과 비교하여 양호한 결과가 얻어질 경우 면역화가 성공한 것으로 보고 세포 간 융합 준비를 하였다. 항체가 낮을 경우 2주후에 다시 면역화를 시도하였다.

***인산염 완충액(phosphate-bufferedsaline,PBS)1liter**

명칭(화학식)	분자량	첨가량	
NaCl	58.450	8 g	3차 증류수 800 ml 첨가, pH 7.4로 교정 후 총량
KCl	74.560	0.2 g	1000 ml 되게 증류수 첨가 후 멸균처리.
Na ₂ HPO ₄	142.00	1.44 g	
KH ₂ PO ₄	136.09	0.24 g	

사. Feeder cell 준비

- 1) 증류수 (DW)에 sucrose를 11.6%로 녹여 멸균 (autoclave, 121°C, 15분) 후 50ml씩 분주하여 냉장고 (4°C)에 보관하였다. 골수종세포 (myeloma)와 비장 세포 (splenocyte)의 융합 18시간 이전에, 12주령 이상의 마우스(암수 및 strain은 관계 없으나 Balb/c 암컷을 기준)의 복부 피부를 벗겨 낸 후 복근 속 복강 내로 8ml의 4°C, 11.6% sucrose (Sigma) 용액을 주입한 후 복강을 마사지 하여 복강 내 대식세포들의 유리를 촉진하였다. 이후 이를 회수하여 (약 6ml 이상) 1300 rpm으로 원심분리한 후 pellet을 PBS 혹은 RPMI-1640 (Sigma) 배지를 이용한 세척한 후 1X HAT (hypoxanthine aminopterin tyridine, Sigma), 20% FBS (fetal bovine serum, Sigma), RPMI-1640에 적절히 풀어 세포배양용 96 well plate (Nunc)에 분주한 후 37°C CO₂ incubator (Binder)에서 배양하였다.
- 2) Feeder cell을 미리 준비하는 것은 융합과정 중 여러 단계를 거치면서 손상을 입은 융합세포들이 feeder cell들이 분비하는 다양한 cytokine들에 의한 치유를 촉진함과 아울러 지나친 세포희석으로 인한 성장 저해를 억제하기 위함이다.

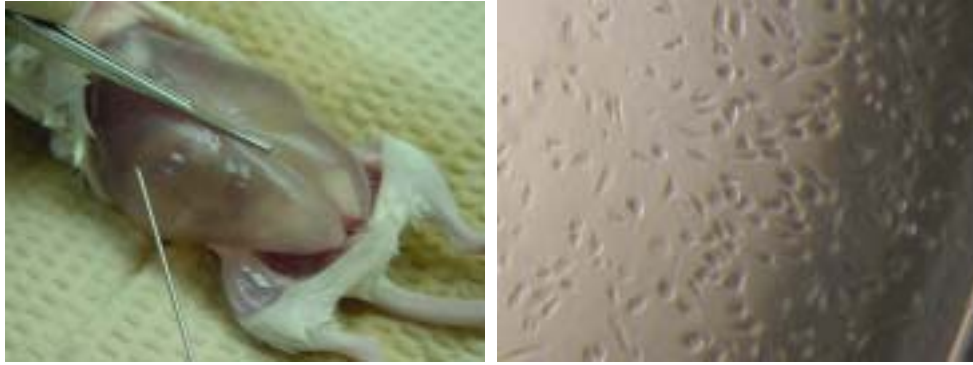


Figure 23. 마우스 복강내 feeder cell 채취 및 배양

아. 비장세포와 골수종세포의 융합 (Cell fusion)

- 1) 세포융합 방법은 Kohler와 Milstein 방법에 따라서 PEG (polyethylene glycol, Sigma)를 fusogen으로 이용하였다. 세포융합 2주전부터 계대해온 골수종세포 (myeloma, Sp2/0-Ag14, HGPRT⁻, 한국세포주은행, 세포의 수가 $7-8 \times 10^5/\text{ml}$ 정도 되면 1/2로 희석 계대하여 다음 날의 실험에 이용)와 항체가 (antibody titer)가 높게 나타난 마우스의 비장세포를 미리 준비한 후 이들을 혼합하여 FBS가 첨가되지 않은 세포배양용 배지로 세척한 후, 미리 가열한 (37°C) 1ml의 polyethylene glycol을 이용하여 1분간에 걸쳐 서서히 저어주면서 융합시켰다.
- 2) 융합 후 수분에 걸쳐 천천히 1X HAT 배지 (20% FBS, RPMI-1640)를 첨가해 주면서 융합과정을 마쳤다. 이러한 전과정은 37°C 항온수조 (water bath)를 이용하여 시행하였다. 전날 준비한 feeder cell이 깔린 96 well plate에 well 당 1개의 집락 (colony)가 생길 정도의 농도로 세포를 HAT가 첨가된 배지로 희석하여 분주하였다. 분주된 96well plate들은 37°C CO₂ incubator에 넣어 7일간 배양하며 screening 단계에 접어들 때까지 incubator를 열지 않았다.

자. 특이성 검사 대상 well의 선별

- o 세포융합을 실시한 후 1주일 (7일)이 경과하면, 각각의 96 well plate를 꺼내어 inverted microscopy에 올려 세포군 (cell colony)의 형성 여부 및 그 정도 (colony의 크기)를 관찰하여 각 well에 표시하였다. 표시된 well 중 colony의 크기가 전체 well 면적의 25% 내외를 차지하는 것들만을 골라 특이성 검사 대상으로 삼았다. 형성되는 colony들의 형태학적 모습은 완전한 부유성, 포도상의 군집성, 부분적인 부착성, 완전

한 부착성 등 다양한 형태가 나타나므로 각기 형태에 대한 세포 밀도 등을 감안하여 선별한 후 분류하였다.



Figure 24. Hybridoma cell colony

차. 단클론 항체의 특이성 검사

1) 효소면역측정법(ELISA)을 이용한 특이성 검사

가) 해당 항원 용액을 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 $100\mu\text{l}$ 씩 96 well plate에 분주하고 37°C , 60분 반응시켰다. 희석액으로는 0.05M sodium bicarbonate 용액을 사용하였다. 반응액을 제거하고 세척액 (인산염 완충액, 0.05% Tween 20) well당 $200\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복하였다. 세척 후 각 well에 차단액 (blocking solution, 1% BSA가 함유된 인산염 완충액)을 $200\mu\text{l}$ 첨가하고 37°C , 30분 반응하였다. 차단액 반응액을 제거하고 상기 세척액을 well당 $200\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복하였다. 단클론 항체 (MAb)용액을 well당 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 음성대조군용 well에 희석액을 $100\mu\text{l}$ 분주한 다음 37°C 에서 60분간 반응시켰다. 반응액을 제거하고 상기 세척액을 well당 $200\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복하였다.

나) 항-마우스 IgG에 HRP (Horse reddish peroxidase)가 융합된 시약을 well당 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 37°C 에서 60분간 반응시켰다. 반응액을 제거하고 상기 세척액을 well당 $200\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복하였다. 효소 기질 용액 (o-phenylenediamine $0.4\text{mg}/\text{ml}$ in phosphate citrate buffer pH 5.0)을 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 암실의 상온 에서 30분간 반응시켰다. 492 nm (yellow)에서 흡광도값을 확인

하여 음성대조군의 흡광도의 3배 이상 되는 흡광도 값을 양성 반응의 최소치로 기준하여 음성, 양성으로 판정하였다.

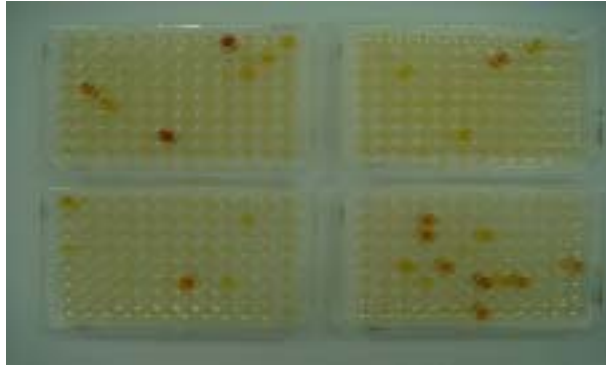


Figure 25. ELISA 결과

2) Western blotting법을 이용한 특이성 검사

가) 정제된 재조합 단백질들을 SDS-PAGE상에서 전기영동한 후 nitrocellulose membrane (0.45um; Bio-Rad)에 재조합 단백질들을 electrotransfer시켰다. Towbin *et al.* (1979)의 방법으로 transfer후 membrane을 blocking buffer (0.01 M PBS, 3% skim milk, Sigma)로 실온에서 하룻밤 동안 blocking하고, ELISA를 통해 검증된 항체액 (hybridoma 세포배양액)을 blocking solution에 적정한 농도로 희석하여 1시간 30분 동안 실온에서 반응시켰다.

나) 각 반응 단계마다 PBS-Tween 20 (0.05%)으로 3번 씻어내었으며, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma)를 blocking solution에 적당한 농도로 희석하여 2시간 반응시켰다. 신선한 substrate solution (0.5 mg/ml diaminobenzidine; 0.01% hydrogen peroxide; 0.1 M PBS, pH 7.2)을 준비하여 실온에서 1분간 반응시켰다. 반응의 증지를 위하여 증류수를 첨가하며 결과는 육안으로 판독하였다. 단클론 항체에 따라서 Western blotting에 응용할 수 없는 특성을 지닌 것들이 있을 수 있어 실시하며 이를 ELISA 시험결과와 아울러 정리하였다.

카. 종세포주 및 생산용 세포주의 관리

1) 일단 원하는 항체를 분비한다고 판단되는 융합 세포주는 limiting dilution 방법으로 1, 2차 클로닝을 수행하여 융합 세포 집단이 하나의 세포로부터 유래되는 클론이 되

게 하였다. 만들어진 단클론항체 세포주를 배지에 부유시켜 37°C, CO₂ 세포배양기에서 3-4일간 증식시킨 뒤 얻은 세포 부유액을 1,300rpm에서 10분간 원심 분리한 후 침전된 세포는 동결방지 보호제 (RPMI-1640 세포배양액에 10% DMSO, 20% FBS 첨가)에 부유시킨 후 동결보존용 앰플에 1ml (1X10⁶cell/ml)씩 분주하고 세포주명, 계대번호, 계대일자 등을 기록한 후 freezing container (Nalgen)에 넣어 deep freezer (-70°C)에 하룻밤 보관 후 영하196°C (액체질소)에 동결 보존하여 원종 세포주로서 차후의 실험에 사용하였다.

- 2) 이후 생산된 원종 단클론 항체 분비 세포주를 꺼내어 37°C 항온수조에서 빠르게 해동시킨 뒤 배지에 부유시켜 37°C CO₂ 세포배양기에서 3-4일간 증식시킨 다음, 증식된 세포 부유액을 1,300rpm에서 10분간 원심 분리한 후 침전된 세포는 동결방지 보호제에 부유시킨 후 동결보존용 앰플에 1ml (1X10⁶cell/ml)씩 분주하고 세포주명, 계대번호, 계대일자 등을 기록한 후 영하 196°C (액체질소)에 동결 보존하여 생산용 단클론 항체 분비 세포주로서 차후의 실험에 사용하였다.

타. 단클론항체의 Isotyping

- 1) 생산된 단클론 항체의 isotyping은 mouse monoclonal antibody isotyping kit (Sigma)을 이용하여 실시하며, 방법은 제조회사의 지침을 따랐다.

파. 단클론항체의 분리 및 정제

- 1) 생후 6-8주된 BALB/c 마우스의 복강에 pristane을 0.5-1 ml 주사하고 해당 항원에 대한 특이적인 항체를 생산하는 세포주를 배지 (RPMI-1640, 10% FBS)에서 키웠다. Pristane 처리 후 1주일 째 되는 날 세포주를 1300 rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 pellet에 적당량의 인산염 완충액 (phosphate-buffered saline, PBS)에 현탁한 뒤 계수하였다. 마우스 한 마리당 1-5 x 10⁶개 정도의 세포를 0.5 ml 인산염 완충액에 현탁하여 복강에 주사하였다.
- 2) 1-2주경과 후 마우스의 배가 부풀어 오르면 주사기를 이용하여 복수를 채취하였으며, 채취된 복수를 1500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 취해진 상등액을 0.45 µm syringe filter를 이용하여 여과한 후 protein G column (Amersham phamacia)으로 통과시켜 항체만을 결합시킨 후 column 3배량의 세정액 (0.05M Tris, 0.15M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 2번 세척한 후 용출액 (0.1M glycine, pH 3.0)을 통과시킴으로써 fraction collector를 이용하여 항체분획을 얻었다.

3) 얻어진 항체액은 desalting column (Amersham phamacia)을 이용하여 차후 실험 목적에 따라 인산염 완충액 (PBS)등의 다양한 완충액으로 교환한 뒤 다음 단계의 실험에 활용하였다.

하. 정제된 항체의 순도 및 농도평가

1) 정제된 항체는 SDS PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 그 순도를 평가하였다. 이때 acrylamide gel은 12%를 이용하였으며, Coomassie blue 염색 (Hoefer auto-processor, Amersham phamacia)를 이용하여 그 순도를 개략적으로 알아내었다. 순도가 불충분할 경우 affinity chromatography를 통과한 정제물을 gel chromatography (size exclusion)을 재차 실시하여 높은 순도의 항체를 얻었다. 만족할 만한 순도의 항체액이 얻어지면 이를 흡광도 평가 (OD₂₈₀에서 1OD 당 0.75 mg/ml으로 환산) 혹은 Bradford method (Bio-rad Bradford reagent)를 이용하여 정량하여 다음 단계의 실험에 이용하였다.

가. 항체 규격 설정 및 평가 system 확립

- 대조 항체 및 자체 제조된 항체를 microplate에 coating한 ELISA를 이용하여 각 균체배양액 (표준균주 *Campylobacter* 등 7균주 및 분리균주 4균주와 대조용 *Campylobacter* 5균주 및 *Salmonella*, *Yersinia* 등의 기타 장내세균)을 ELISA assay하여 민감도 및 항체의 특이성을 검사하여 *Campylobacter* 표준 균주들은 모두 검출하고 기타 장내세균에 대하여 위양성을 나타내지 않은 항체의 규격을 설정하였다.

1) 항체의 민감도 평가 시험

o 균주 접종에 의한 감도시험 *Campylobacter* 균주를 배양하여 완충액으로 연속 희석하여 1~100균체/ml로 얻어 검체(계육 등) 25g에 1ml씩 접종하여 검체를 배양한 다음 민감도 검사 실시하였다.

2) 항체의 특이성 평가시험

o 일반 장내세균들과 *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella* 및 *E. coli* 등과 같은 장내세균들과 교차반응을 test하고 일반 미생물들과의 교차반응성도 아울러 조사하였다.

2. 연구결과

가. *Campylobacter* 단클론항체 제작

1) 면역

가) 항원 : KLH conjugated synthetic peptide 3종 혼합 항원

(1) Cad F1 (16mer): AA 125-140: FGHYGAGVKFRLSDSL

(2) Cad F2 (16mer): AA 131-146: GVKFRLSDSLALRLET

(3) Cad F3 (30mer): AA 117-146: AYDNKSGGFGHYGA GVKFRLSDSLALRLET

* GVKFRLSDSL: overlapping region

나) 면역동물: Balb/C mouse

다) 면역방법

(1) 1-8차 : 3종 항원을 각각 1mg씩 혼합하여 2주간격으로 IP

(2) 5차 접종 후 채혈하여 항체검사 실시(ELISA)

(3) 8차 접종 3일 후에 세포융합

2) 세포융합

가) Myeloma cell line: SP2/0 Ag14(ATCC, USA)

나) Medium : D-MEM

다) Fusion method : PEG method(spleen cell)

3) 하이브리도마 스크린 및 클로닝

가) 1차 스크린 항원: Peptide 3종 면역항원의 OVA conjugated peptide(1ug/ml)

Campylobacter OMP Antigen(1ug/ml) *Campylobacter* Whole cell(OD=1)대조항원:

OVA (1ug/ml), 교차반응 대상 OMP 항원(4종)방법 : Indirect ELISA

나) 2차 스크린(Cloning)Limiting dilution(한계희석법)항원: Peptide Cad F1 OVA

conjugated peptide *Campylobacter* Whole cell(OD=1) 대조항원 : 교차반응 대상

Whole cell 항원(4종)

4) 마우스 혈청 항체 검사

가) 방법

(1) 3종 펩타이드 혼합 항원 5차 면역 후 미정맥 채혈

(2) Indirect ELISA

(가) 각 항원을 1ug/ml로 희석하여 흡착 (Target Antigen: OVA conjugated peptide, Control Antigen: OVA)

(나) 혈청: 1/80 부터 1/2,560까지 희석하여 반응

나) 결과

Antigen	CadF1(AA125-140)		CadF2(AA131-146)		CadF3(AA117-146)		OVA	
	Srum	면역전 5차면역후	면역전 5차면역후	면역전 5차면역후	면역전 5차면역후	면역전 5차면역후	면역전 5차면역후	
1/80	0.072	3.194	0.080	1.895	0.095	2.502	0.056	0.073
1/160	0.057	3.177	0.077	1.437	0.092	2.303	0.051	0.069
1/320	0.052	3.123	0.079	1.009	0.092	2.059	0.046	0.070
1/640	0.053	2.569	0.078	0.729	0.089	1.812	0.045	0.088
1/1280	0.052	2.519	0.075	0.466	0.089	1.326	0.046	0.085
1/2560	0.050	2.001	0.076	0.310	0.087	0.906	0.045	0.073

5) 스크린 결과

가) 1차 스크린 검사 결과

(1) Plate 1(Clone name)

1-1A	1-2A	1-3A	1-4A	1-5A	1-6A	1-7A	1-8A	1-9A	1-10A	1-11A	1-12A
1-1B	1-2B	1-3B	1-4B	1-5B	1-6B	1-7B	1-8B	1-9B	1-10B	1-11B	1-12B
1-1C	1-2C	1-3C	1-4C	1-5C	1-6C	1-7C	1-8C	1-9C	1-10C	1-11C	1-12C
1-1D	1-2D	1-3D	1-4D	1-5D	1-6D	1-7D	1-8D	1-9D	1-10D	1-11D	1-12D
1-1E	1-2E	1-3E	1-4E	1-5E	1-6E	1-7E	1-8E	1-9E	1-10E	1-11E	1-12E
1-1F	1-2F	1-3F	1-4F	1-5F	1-6F	1-7F	1-8F	1-9F	1-10F	1-11F	1-12F
1-1G	1-2G	1-3G	1-4G	1-5G	1-6G	1-7G	1-8G	1-9G	1-10G	1-11G	1-12G
1-1H	1-2H	1-3H	1-4H	1-5H	1-6H	1-7H	1-8H	1-9H	1-10H	1-11H	1-12H

Peptide Cad F1 OD

0.966	1.846	0.183	0.329	0.354	1.726	0.771	0.298	0.284	2.034	0.663	1.888
0.257	0.290	0.176	0.144	1.457	1.793	0.369	0.153	0.245	1.852	0.189	1.131
0.333	0.234	0.119	0.175	1.661	0.300	0.123	0.218	0.361	1.612	0.934	1.398
3.199	2.116	2.002	1.870	1.296	0.121	1.887	0.151	0.105	0.130	0.083	1.991
0.742	0.325	0.118	0.278	1.957	0.110	0.145	0.111	1.700	0.137	0.178	0.219
0.130	0.913	0.498	2.252	0.133	2.025	0.105	0.115	0.199	0.082	0.100	2.051
0.179	0.771	0.142	0.085	1.409	0.160	0.095	0.085	1.622	0.102	0.131	1.921
1.881	1.611	0.267	1.928	1.883	1.945	0.186	0.172	1.842	1.770	0.300	0.474

Peptide Cad F2 OD

0.966	1.846	0.183	0.329	0.354	1.726	0.771	0.298	0.284	2.034	0.663	1.888
0.257	0.290	0.176	0.144	1.457	1.793	0.369	0.153	0.245	1.852	0.189	1.131
0.333	0.234	0.119	0.175	1.661	0.300	0.123	0.218	0.361	1.612	0.934	1.398
3.199	2.116	2.002	1.870	1.296	0.121	1.887	0.151	0.105	0.130	0.083	1.991
0.742	0.325	0.118	0.278	1.957	0.110	0.145	0.111	1.700	0.137	0.178	0.219
0.130	0.913	0.498	2.252	0.133	2.025	0.105	0.115	0.199	0.082	0.100	2.051
0.179	0.771	0.142	0.085	1.409	0.160	0.095	0.085	1.622	0.102	0.131	1.921
1.881	1.611	0.267	1.928	1.883	1.945	0.186	0.172	1.842	1.770	0.300	0.474

Peptide Cad F3 OD

0.093	0.081	0.060	0.065	0.067	0.933	0.130	0.059	0.062	0.072	0.063	0.187
0.057	0.056	0.054	0.054	0.072	0.348	0.054	0.055	0.067	0.094	0.064	0.109
0.059	0.056	0.051	0.077	0.064	0.055	0.058	0.058	0.058	0.065	0.055	0.083
0.067	0.058	0.460	0.057	0.072	0.057	0.394	0.061	0.053	0.056	0.054	0.084
0.056	0.079	0.055	0.078	0.062	0.055	0.054	0.051	0.244	0.055	0.075	0.063
0.069	0.067	0.057	0.328	0.051	0.071	0.056	0.060	0.057	0.054	0.054	0.328
0.070	0.066	0.054	0.071	0.215	0.061	0.055	0.053	0.462	0.054	0.054	0.437
0.061	0.070	0.061	0.181	0.835	0.090	0.070	0.063	0.262	0.177	0.067	0.064

Campylobacter jejuni OMP OD

0.966	1.846	0.183	0.329	0.354	1.726	0.771	0.298	0.284	2.034	0.663	1.888
0.257	0.290	0.176	0.144	1.457	1.793	0.369	0.153	0.245	1.852	0.189	1.131
0.333	0.234	0.119	0.175	1.661	0.300	0.123	0.218	0.361	1.612	0.934	1.398
3.199	2.116	2.002	1.870	1.296	0.121	1.887	0.151	0.105	0.130	0.083	1.991
0.742	0.325	0.118	0.278	1.957	0.110	0.145	0.111	1.700	0.137	0.178	0.219
0.130	0.913	0.498	2.252	0.133	2.025	0.105	0.115	0.199	0.082	0.100	2.051
0.179	0.771	0.142	0.085	1.409	0.160	0.095	0.085	1.622	0.102	0.131	1.921
1.881	1.611	0.267	1.928	1.883	1.945	0.186	0.172	1.842	1.770	0.300	0.474

Campylobacter jejuni Whole cell OD

0.379	0.257	0.166	0.262	0.169	0.959	0.140	0.153	0.145	0.150	0.143	0.183
0.339	0.146	0.146	0.163	0.140	1.350	0.139	0.130	0.177	0.120	0.141	0.149
0.448	0.130	0.134	0.135	0.160	0.132	0.142	0.125	0.122	0.121	0.132	0.140
0.137	0.152	1.897	0.182	0.155	0.183	0.288	0.124	0.117	0.129	0.132	0.172
0.159	0.155	0.150	0.139	0.125	0.123	0.158	0.127	0.129	0.621	0.120	0.178
0.144	0.144	0.152	0.247	0.121	0.128	0.175	0.159	0.872	0.121	0.129	0.512
0.194	0.935	0.135	0.127	0.709	0.144	0.136	0.121	0.125	0.148	0.124	0.182
0.164	0.167	0.155	0.144	1.339	0.137	0.146	0.157	0.148	0.190	0.262	0.165

OVA OD

0.966	1.846	0.183	0.329	0.354	1.726	0.771	0.298	0.284	2.034	0.663	1.888
0.257	0.290	0.176	0.144	1.457	1.793	0.369	0.153	0.245	1.852	0.189	1.131
0.333	0.234	0.119	0.175	1.661	0.300	0.123	0.218	0.361	1.612	0.934	1.398
3.199	2.116	2.002	1.870	1.296	0.121	1.887	0.151	0.105	0.130	0.083	1.991
0.742	0.325	0.118	0.278	1.957	0.110	0.145	0.111	1.700	0.137	0.178	0.219
0.130	0.913	0.498	2.252	0.133	2.025	0.105	0.115	0.199	0.082	0.100	2.051
0.179	0.771	0.142	0.085	1.409	0.160	0.095	0.085	1.622	0.102	0.131	1.921
1.881	1.611	0.267	1.928	1.883	1.945	0.186	0.172	1.842	1.770	0.300	0.474

(2) Plate 2(Clone name)

2-1A	2-2A	2-3A	2-4A	2-5A	2-6A	2-7A	2-8A	2-9A	2-10A	2-11A	2-12A
2-1B	2-2B	2-3B	2-4B	2-5B	2-6B	2-7B	2-8B	2-9B	2-10B	2-11B	2-12B
2-1C	2-2C	2-3C	2-4C	2-5C	2-6C	2-7C	2-8C	2-9C	2-10C	2-11C	2-12C
2-1D	2-2D	2-3D	2-4D	2-5D	2-6D	2-7D	2-8D	2-9D	2-10D	2-11D	2-12D
2-1E	2-2E	2-3E	2-4E	2-5E	2-6E	2-7E	2-8E	2-9E	2-10E	2-11E	2-12E
2-1F	2-2F	2-3F	2-4F	2-5F	2-6F	2-7F	2-8F	2-9F	2-10F	2-11F	2-12F
2-1G	2-2G	2-3G	2-4G	2-5G	2-6G	2-7G	2-8G	2-9G	2-10G	2-11G	2-12G
2-1H	2-2H	2-3H	2-4H	2-5H	2-6H	2-7H	2-8H	2-9H	2-10H	2-11H	2-12H

Peptide Cad F1 OD

0.276	0.307	0.179	1.340	0.149	0.129	0.189	0.100	0.267	0.998	1.194	0.231
1.328	0.149	1.262	0.131	0.133	0.110	1.251	0.110	0.164	0.181	1.206	0.136
0.122	0.313	0.154	0.148	0.171	0.125	0.155	0.268	0.091	0.108	0.129	1.283
1.419	0.129	1.387	0.108	0.152	0.111	0.260	1.168	0.104	0.148	0.150	0.163
0.098	0.085	0.205	0.097	0.257	0.129	0.094	0.302	0.103	1.386	0.943	0.129
0.088	0.080	0.141	0.149	0.115	0.114	1.121	0.147	0.146	0.148	1.248	0.141
0.839	0.143	0.130	1.162	1.172	0.131	0.877	0.197	0.087	0.113	0.711	1.237
0.102	0.156	0.287	0.805	0.217	1.288	0.152	0.136	0.162	0.123	0.130	1.219

Peptide Cad F2 OD

0.077	0.076	0.070	0.068	0.069	0.494	0.074	0.067	0.065	0.096	0.070	0.072
0.068	0.062	0.097	0.058	0.064	0.058	0.059	0.063	0.065	1.192	0.073	0.074
0.064	0.078	0.070	0.054	0.066	0.057	0.062	0.058	0.058	0.087	0.057	0.062
0.060	0.059	0.061	0.054	0.063	0.061	0.065	0.069	0.062	0.057	0.059	0.060
0.063	0.060	0.491	0.068	0.063	0.070	0.098	0.070	0.064	0.069	0.057	0.061
0.258	0.057	0.060	0.063	0.086	0.063	0.124	0.058	0.062	0.055	0.064	0.061
0.093	0.089	0.061	0.066	0.062	0.059	0.057	0.061	0.058	0.067	0.071	0.066
0.069	0.069	0.071	0.071	0.066	0.063	0.070	0.075	0.075	0.074	0.067	0.428

Peptide Cad F3 OD

0.069	0.078	0.072	1.034	0.068	0.078	0.084	0.069	0.063	0.093	0.068	0.074
0.265	0.060	0.383	0.061	0.062	0.070	1.341	0.060	0.056	0.079	1.086	0.070
0.062	0.064	0.070	0.061	0.075	0.067	0.071	0.075	0.057	0.058	0.058	1.266
1.074	0.065	0.457	0.058	0.063	0.065	0.078	0.081	0.061	0.070	0.059	0.074
0.063	0.063	0.068	0.061	0.085	0.073	0.062	0.111	0.064	0.064	0.058	0.068
0.058	0.061	0.063	0.066	0.058	0.063	0.251	0.061	0.064	0.077	1.278	0.067
0.102	0.068	0.061	0.059	0.097	0.061	0.108	0.071	0.059	0.065	0.070	0.388
0.067	0.071	0.067	0.066	0.064	0.090	0.073	0.069	0.073	0.073	0.076	0.121

Campylobacter jejuni OMP OD

0.084	0.095	0.096	0.153	0.087	0.102	0.091	0.087	0.103	0.093	0.100	0.079
0.129	0.088	0.089	0.072	0.073	0.080	0.065	0.068	0.070	0.076	0.076	0.081
0.086	0.088	0.078	0.073	0.079	0.071	0.108	0.073	0.105	0.066	0.072	0.086
0.083	0.069	0.072	0.062	0.074	0.073	0.069	0.070	0.068	0.071	0.073	0.072
0.075	0.065	0.069	0.067	0.094	0.070	0.067	0.079	0.069	0.071	0.070	0.141
0.074	0.076	0.083	0.097	0.072	0.074	0.215	0.076	0.078	0.092	0.124	0.082
0.096	0.094	0.072	0.085	0.079	0.081	0.096	0.075	0.129	0.085	0.079	0.088
0.075	0.095	0.079	0.082	0.086	0.084	0.114	0.093	0.092	0.092	0.109	0.148

Campylobacter jejuni Whole cell OD

0.185	0.159	0.179	1.231	0.162	0.192	0.156	0.148	0.140	0.147	0.150	0.158
1.456	0.182	0.186	0.140	0.131	0.152	0.234	0.163	0.139	0.134	0.129	0.224
0.162	0.227	0.162	0.129	0.124	0.135	0.242	0.153	0.181	0.120	0.143	1.313
0.174	0.132	0.146	0.122	0.136	0.157	0.129	0.159	0.121	0.121	0.142	0.123
0.174	0.127	0.159	0.132	0.226	0.124	0.117	0.132	0.128	0.124	0.123	0.166
0.190	0.180	0.168	0.140	0.137	0.136	0.282	0.139	0.148	0.132	0.247	0.134
0.150	0.131	0.127	0.197	0.170	0.131	0.130	0.124	0.263	0.135	0.147	0.637
0.151	0.214	0.156	0.160	0.164	0.141	0.153	0.152	0.159	0.143	0.296	0.299

OVA OD

0.076	0.080	0.075	0.072	0.070	0.076	0.073	0.068	0.070	0.070	0.071	0.068
0.066	0.065	0.066	0.063	0.063	0.064	0.058	0.060	0.058	0.061	0.058	0.066
0.071	0.063	0.069	0.062	0.071	0.065	0.062	0.061	0.060	0.058	0.059	0.064
0.064	0.060	0.060	0.057	0.062	0.061	0.064	0.062	0.061	0.059	0.061	0.063
0.060	0.059	0.062	0.066	0.067	0.061	0.059	0.069	0.059	0.061	0.058	0.062
0.061	0.062	0.073	0.064	0.063	0.064	0.102	0.063	0.061	0.061	0.065	0.065
0.085	0.067	0.067	0.063	0.062	0.067	0.065	0.061	0.064	0.061	0.063	0.068
0.070	0.068	0.073	0.066	0.062	0.067	0.073	0.073	0.071	0.064	0.066	0.082

o 1차 클론 선발: 15개 클론을 대상으로 교차반응 검사 실시

1-1A, 1-1C, 1-2A, 1-2G, 1-3D, 1-5G, 1-5H, 1-6A, 1-6B, 1-7D, 1-12F, 2-1B, 2-4A, 2-12C, 2-12G

나) 교차반응 검사

ELISA OD

Clone name	Isotyping	(Whole cell)	(OMP)			
		<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>E.coli</i> O157 H7	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1-1A	-	0.137	0.050	0.057	0.046	0.052
1-1C	IgM	0.476	0.047	0.057	0.045	0.051
1-2A	-	0.106	0.046	0.071	0.049	0.107
1-2G	IgM	0.169	0.055	0.064	0.053	0.060
1-3D	IgG1	0.820	0.069	0.082	0.047	0.050
1-5G	-	0.183	0.053	0.069	0.047	0.048
1-5H	-	0.332	0.051	0.071	0.045	0.059
1-6A	IgM	0.266	0.044	0.067	0.046	0.048
1-6B	-	0.451	0.050	0.060	0.045	0.060
1-7D	IgM	0.194	0.047	0.063	0.044	0.060
1-12F	IgM	0.199	0.047	0.076	0.051	0.055
2-1B	IgG1, IgM	0.654	0.043	0.059	0.047	0.056
2-4A	IgM	0.573	0.043	0.062	0.046	0.067
2-12C	IgG1	0.959	0.050	0.063	0.045	0.052
2-12G	-	0.213	0.047	0.059	0.048	0.056

(1) 1차 최종 클론 선발

ELISA OD

Clone	Cad F1	Cad F2	Cad F3	<i>Campylobacter</i> whole cell
1-3D	2.002	0.060	0.460	1.897
2-1B	1.328	0.068	0.265	1.456
2-12C	1.283	0.062	1.266	1.313

다) 2차 스크린 검사 결과

(1) Plate 1(Clone name)

1B1	1B9	1B17	1B25	1B33	1B41	1B49	3D1	3D9	3D17	3D25	3D33
1B2	1B10	1B18	1B26	1B34	1B42	1B50	3D2	3D10	3D18	3D26	3D34
1B3	1B11	1B19	1B27	1B35	1B43	1B51	3D3	3D11	3D19	3D27	3D35
1B4	1B12	1B20	1B28	1B36	1B44	1B52	3D4	3D12	3D20	3D28	3D36
1B5	1B13	1B21	1B29	1B37	1B45	1B53	3D5	3D13	3D21	3D29	3D37
1B6	1B14	1B22	1B30	1B38	1B46	1B54	3D6	3D14	3D22	3D30	3D38
1B7	1B15	1B23	1B31	1B39	1B47	1B55	3D7	3D15	3D23	3D31	3D39
1B8	1B16	1B24	1B32	1B40	1B48	1B56	3D8	3D16	3D24	3D32	3D40

Peptide Cad F1 OD

0.121	0.102	0.053	0.058	0.052	0.055	0.058	0.172	0.268	0.068	0.057	0.055
0.049	0.051	0.051	0.060	0.050	0.050	0.049	0.056	0.134	0.049	0.046	0.128
0.142	0.057	0.107	0.098	0.105	0.052	0.051	1.840	1.645	0.116	0.497	0.065
0.047	0.046	0.049	0.046	0.048	0.067	0.054	0.229	0.062	0.172	0.065	0.111
0.102	0.106	0.048	0.053	0.099	0.051	0.061	0.068	0.151	0.051	0.227	0.127
0.061	0.047	0.059	0.048	0.109	0.052	0.108	0.055	0.495	0.054	1.994	0.079
0.052	0.058	0.050	0.049	0.046	0.079	0.079	0.067	1.717	0.053	0.056	0.076
0.054	0.115	0.123	0.055	0.053	0.050	0.064	0.062	0.173	0.080	0.059	0.079

Campylobacter jejuni Whole cell OD

0.124	0.124	0.103	0.104	0.104	0.101	0.110	0.104	0.190	0.110	0.102	0.108
0.103	0.098	0.100	0.105	0.098	0.097	0.096	0.095	0.096	0.100	0.094	0.132
0.103	0.110	0.109	0.105	0.104	0.096	0.098	0.369	0.496	0.096	0.095	0.160
0.101	0.095	0.098	0.094	0.097	0.095	0.101	0.100	0.093	0.099	0.098	0.126
0.108	0.105	0.095	0.096	0.103	0.095	0.108	0.108	0.095	0.095	0.091	0.098
0.123	0.097	0.106	0.101	0.109	0.100	0.102	0.100	0.099	0.098	0.400	0.109
0.107	0.108	0.102	0.098	0.096	0.101	0.099	0.100	0.489	0.099	0.093	0.138
0.109	0.124	0.129	0.109	0.100	0.105	0.105	0.105	0.105	0.106	0.099	0.112

Salmonella enteritidis Whole cell OD

0.080	0.093	0.063	0.065	0.060	0.062	0.068	0.060	0.177	0.074	0.066	0.062
0.059	0.060	0.060	0.066	0.057	0.056	0.056	0.059	0.061	0.060	0.057	0.061
0.062	0.066	0.078	0.074	0.069	0.060	0.058	0.162	0.351	0.058	0.059	0.080
0.059	0.056	0.058	0.057	0.057	0.059	0.061	0.060	0.056	0.067	0.067	0.071
0.102	0.067	0.059	0.061	0.068	0.060	0.066	0.067	0.067	0.057	0.057	0.061
0.070	0.057	0.064	0.058	0.069	0.062	0.066	0.063	0.060	0.059	0.185	0.076
0.070	0.062	0.059	0.057	0.057	0.062	0.059	0.059	0.297	0.060	0.059	0.070
0.062	0.071	0.091	0.067	0.059	0.066	0.064	0.064	0.061	0.064	0.064	0.068

E. coli O157 H7 Whole cell OD

0.071	0.066	0.057	0.058	0.055	0.123	0.058	0.055	0.226	0.061	0.058	0.058
0.053	0.054	0.056	0.062	0.052	0.054	0.053	0.055	0.057	0.056	0.055	0.057
0.055	0.060	0.065	0.062	0.059	0.058	0.054	0.064	0.079	0.055	0.057	0.119
0.052	0.053	0.054	0.051	0.052	0.054	0.058	0.057	0.053	0.060	0.068	0.084
0.063	0.060	0.053	0.055	0.058	0.054	0.063	0.061	0.058	0.054	0.055	0.059
0.064	0.055	0.061	0.052	0.058	0.062	0.060	0.057	0.057	0.056	0.067	0.104
0.056	0.061	0.056	0.058	0.052	0.056	0.054	0.054	0.073	0.058	0.058	0.071
0.058	0.064	0.076	0.059	0.053	0.056	0.055	0.056	0.056	0.056	0.064	0.068

Listeria monocytogenes Whole cell OD

0.083	0.083	0.079	0.076	0.074	0.080	0.078	0.076	0.251	0.087	0.072	0.073
0.074	0.075	0.076	0.079	0.079	0.076	0.080	0.081	0.085	0.084	0.078	0.074
0.078	0.079	0.085	0.086	0.084	0.081	0.079	0.085	0.091	0.081	0.079	0.103
0.074	0.074	0.074	0.076	0.081	0.083	0.084	0.081	0.076	0.079	0.084	0.079
0.082	0.081	0.080	0.075	0.085	0.084	0.088	0.089	0.081	0.080	0.077	0.081
0.090	0.077	0.085	0.075	0.082	0.086	0.087	0.087	0.079	0.080	0.085	0.090
0.078	0.083	0.079	0.074	0.079	0.085	0.084	0.081	0.085	0.081	0.072	0.126
0.080	0.085	0.093	0.080	0.076	0.078	0.075	0.078	0.073	0.079	0.089	0.090

Staphylococcus aureus Whole cell OD

0.075	0.074	0.066	0.069	0.063	0.066	0.070	0.064	0.127	0.135	0.070	0.067
0.066	0.061	0.064	0.066	0.061	0.059	0.061	0.064	0.067	0.064	0.061	0.065
0.206	0.066	0.080	0.073	0.069	0.063	0.060	0.071	0.087	0.061	0.060	0.084
0.211	0.059	0.062	0.059	0.060	0.061	0.064	0.063	0.060	0.100	0.067	0.070
0.067	0.076	0.061	0.060	0.063	0.062	0.066	0.067	0.121	0.059	0.057	0.065
0.071	0.069	0.067	0.060	0.072	0.065	0.066	0.068	0.063	0.061	0.068	0.076
0.062	0.068	0.070	0.060	0.061	0.064	0.062	0.072	0.085	0.061	0.064	0.079
0.079	0.077	0.094	0.067	0.062	0.064	0.064	0.064	0.071	0.064	0.064	0.074

(2) Plate 2(Clone name)

3D41	3D49	3D57	12C1	12C9	12C17	12C25	12C33	12C41	12C49	12C57	12C65
3D42	3D50	3D58	12C2	12C10	12C18	12C26	12C34	12C42	12C50	12C58	12C66
3D43	3D51	3D59	12C3	12C11	12C19	12C27	12C35	12C43	12C51	12C59	12C67
3D44	3D52	3D60	12C4	12C12	12C20	12C28	12C36	12C44	12C52	12C60	12C68
3D45	3D53	3D61	12C5	12C13	12C21	12C29	12C37	12C45	12C53	12C61	12C69
3D46	3D54	3D62	12C6	12C14	12C22	12C30	12C38	12C46	12C54	12C62	12C70
3D47	3D55	3D63	12C7	12C15	12C23	12C31	12C39	12C47	12C55	12C63	12C71
3D48	3D56		12C8	12C16	12C24	12C32	12C40	12C48	12C56	12C64	12C72

Peptide Cad F1 OD

0.048	0.047	0.050	0.049	0.060	0.048	0.057	0.056	0.045	0.063	0.045	0.060
0.096	1.022	0.048	0.063	0.050	0.056	1.104	0.051	0.047	0.045	0.049	0.055
0.500	0.056	0.048	0.068	0.049	0.051	0.048	0.048	0.051	0.053	0.054	0.052
0.070	0.077	0.049	0.045	0.052	0.077	0.057	0.070	0.046	0.053	0.045	0.057
0.052	0.089	0.097	0.046	0.046	0.048	0.051	1.382	0.052	0.045	0.052	0.054
0.057	0.104	1.196	0.048	0.061	0.049	0.051	0.049	0.066	0.049	0.054	0.063
0.050	1.210	0.049	0.046	0.050	0.055	0.047	0.052	0.047	0.058	0.052	0.065
0.100	0.072	0.046	0.047	0.055	0.052	0.051	0.046	0.047	0.048	1.294	0.078

Campylobacter jejuni Whole cell OD

0.092	0.095	0.096	0.098	0.102	0.091	0.096	0.098	0.092	0.096	0.095	0.108
0.097	0.109	0.091	0.092	0.088	0.102	0.381	0.118	0.090	0.095	0.098	0.104
0.110	0.096	0.092	0.098	0.091	0.094	0.094	0.096	0.091	0.102	0.104	0.106
0.101	0.096	0.091	0.090	0.093	0.099	0.103	0.105	0.092	0.093	0.093	0.137
0.089	0.095	0.094	0.090	0.090	0.091	0.092	0.340	0.097	0.094	0.100	0.112
0.102	0.093	0.317	0.092	0.087	0.091	0.093	0.091	0.094	0.097	0.102	0.101
0.091	0.516	0.090	0.092	0.098	0.103	0.089	0.094	0.091	0.103	0.093	0.119
0.097	0.114	0.092	0.093	0.098	0.097	0.094	0.089	0.098	0.098	0.459	0.191

Salmonella enteritidis Whole cell OD

0.065	0.057	0.065	0.065	0.062	0.065	0.062	0.065	0.056	0.067	0.059	0.073
0.066	0.063	0.061	0.059	0.060	0.063	0.151	0.059	0.061	0.057	0.062	0.064
0.073	0.065	0.058	0.065	0.062	0.077	0.068	0.062	0.062	0.064	0.067	0.060
0.069	0.060	0.058	0.059	0.060	0.065	0.064	0.062	0.057	0.063	0.057	0.064
0.059	0.065	0.137	0.055	0.058	0.059	0.060	0.125	0.066	0.059	0.060	0.075
0.076	0.062	0.102	0.057	0.056	0.062	0.062	0.064	0.058	0.066	0.062	0.060
0.063	0.294	0.068	0.057	0.065	0.064	0.057	0.064	0.060	0.066	0.060	0.072
0.065	0.074	0.059	0.057	0.067	0.066	0.060	0.060	0.060	0.057	0.194	0.068

E. coli O157 H7 Whole cell OD

0.059	0.055	0.063	0.067	0.070	0.069	0.056	0.060	0.055	0.059	0.052	0.060
0.059	0.060	0.056	0.058	0.053	0.062	0.061	0.054	0.057	0.055	0.056	0.061
0.079	0.062	0.054	0.062	0.054	0.059	0.056	0.056	0.058	0.060	0.059	0.059
0.061	0.054	0.053	0.056	0.054	0.062	0.060	0.076	0.059	0.056	0.069	0.083
0.055	0.060	0.056	0.052	0.053	0.057	0.054	0.058	0.057	0.054	0.057	0.097
0.070	0.059	0.058	0.051	0.052	0.058	0.056	0.054	0.054	0.057	0.059	0.053
0.055	0.079	0.055	0.053	0.059	0.060	0.052	0.055	0.053	0.062	0.055	0.064
0.059	0.069	0.051	0.054	0.059	0.059	0.057	0.053	0.056	0.053	0.066	0.056

Listeria monocytogenes Whole cell OD

0.071	0.071	0.070	0.073	0.076	0.077	0.084	0.091	0.077	0.082	0.079	0.079
0.074	0.074	0.074	0.077	0.075	0.083	0.086	0.078	0.086	0.076	0.080	0.078
0.097	0.075	0.071	0.075	0.077	0.083	0.088	0.083	0.081	0.087	0.084	0.113
0.079	0.074	0.078	0.074	0.079	0.084	0.081	0.081	0.083	0.084	0.078	0.106
0.071	0.077	0.077	0.074	0.078	0.081	0.082	0.083	0.081	0.083	0.083	0.084
0.080	0.079	0.076	0.074	0.073	0.078	0.083	0.082	0.080	0.088	0.081	0.081
0.072	0.089	0.072	0.072	0.078	0.084	0.075	0.084	0.079	0.084	0.080	0.090
0.076	0.082	0.073	0.073	0.078	0.082	0.080	0.079	0.077	0.078	0.095	0.090

Staphylococcus aureus Whole cell OD

0.072	0.069	0.063	0.064	0.068	0.066	0.069	0.075	0.060	0.063	0.060	0.073
0.065	0.071	0.092	0.070	0.059	0.067	0.071	0.062	0.061	0.058	0.061	0.070
0.104	0.064	0.059	0.064	0.060	0.063	0.059	0.061	0.060	0.066	0.064	0.083
0.082	0.060	0.060	0.059	0.060	0.066	0.067	0.065	0.058	0.060	0.061	0.069
0.058	0.069	0.064	0.062	0.063	0.062	0.064	0.065	0.072	0.059	0.064	0.069
0.064	0.071	0.069	0.068	0.062	0.069	0.063	0.061	0.059	0.061	0.064	0.065
0.088	0.091	0.057	0.058	0.062	0.068	0.059	0.061	0.059	0.066	0.060	0.078
0.086	0.079	0.061	0.060	0.066	0.068	0.062	0.060	0.058	0.060	0.085	0.080

(3) Plate 3(Clone name)

12C74	12C82	12C89
12C75	12C83	12C90
12C76	12C73	12C91
12C77	12C84	
12C78	12C85	
12C79	12C86	
12C80	12C87	
12C81	12C88	

Peptide-Cad F1		
1.014	0.081	0.051
0.050	0.111	0.061
0.051	0.052	0.054
0.061	0.061	
0.063	0.062	
0.063	0.067	
0.061	0.059	
0.052	0.076	

<i>C. jejuni</i>		
0.289	0.130	0.097
0.104	0.103	0.103
0.107	0.098	0.102
0.101	0.103	
0.106	0.102	
0.106	0.099	
0.101	0.103	
0.099	0.116	

<i>S. enteritidis</i>		
0.103	0.092	0.063
0.060	0.068	0.066
0.064	0.062	0.064
0.067	0.065	
0.071	0.069	
0.068	0.066	
0.064	0.066	
0.066	0.076	

<i>E. coli</i> O157 H7		
0.084	0.077	0.058
0.056	0.062	0.063
0.057	0.060	0.057
0.061	0.058	
0.059	0.064	
0.060	0.060	
0.061	0.062	
0.057	0.072	

<i>Listeria monocytogenes</i>		
0.099	0.106	0.079
0.079	0.085	0.083
0.087	0.085	0.083
0.085	0.085	
0.086	0.092	
0.080	0.090	
0.077	0.088	
0.082	0.094	

<i>S. aureus</i>		
0.079	0.086	0.069
0.063	0.071	0.068
0.066	0.068	0.064
0.071	0.067	
0.077	0.072	
0.074	0.073	
0.068	0.069	
0.068	0.077	

(4) 2차 클론 선발(OD)

Clone name	Peptide	<i>E.coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>S. enteritidis</i>	P/N (C. J/S. E)
	Cad F1	Whole cell	Whole cell	Whole cell	Whole cell	Whole cell	
3D3	1.840	0.064	0.085	0.071	0.369	0.162	2.278
3D15	1.717	0.073	0.079	0.085	0.489	0.297	1.646
3D30	1.994	0.067	0.085	0.068	0.400	0.185	2.162
3D55	1.210	0.079	0.089	0.091	0.516	0.294	1.755
3D62	1.196	0.058	0.076	0.069	0.317	0.102	3.108
12C26	1.104	0.061	0.086	0.071	0.381	0.151	2.523
12C37	1.382	0.058	0.083	0.065	0.340	0.125	2.720
12C74	1.014	0.066	0.095	0.085	0.289	0.103	2.806

6) 최종클론선발

최종선발 클론: 3 개

Fusion LOT	Clone name	Peptide Cad F1	<i>C. jejuni</i>	Isotype
121	3D3	1.840	0.369	IgG1
	3D30	1.994	0.400	IgG1
	12C26	1.104	0.381	IgG1

나. Kit제조 및 효능평가

o Kit의 구성 및 제조공정은 연구방법에서 논의한 바와 같으며 완성된 kit의 효능평가 결과는 다음과 같다.

1) 진단 kit의 구성

- 가) 흡수지 6±0.6mm × 20±2mm
- 나) 샘플패드 6±0.6mm × 20±2mm
- 다) 금콜로이드 흡착패드 6±0.6mm × 6±0.6mm
- 라) 단 클론 항-인간항체 융합 금콜로이드
또는 (항원 검출용 진단 kit의 경우)

단 클론 항-표적 단백질 융합 금콜로이드	50±5 μ l
마) 나이트로셀룰로오즈 막	6±0.6mm × 25±2.5mm
바) 대조선	5±0.5 μ g
사) 검사선 (test line)	5±0.5 μ g
아) 폴리에스테르필름 (plastic backing)	6±0.6mm × 62±6.2mm
자) 플라스틱 케이스	1EA

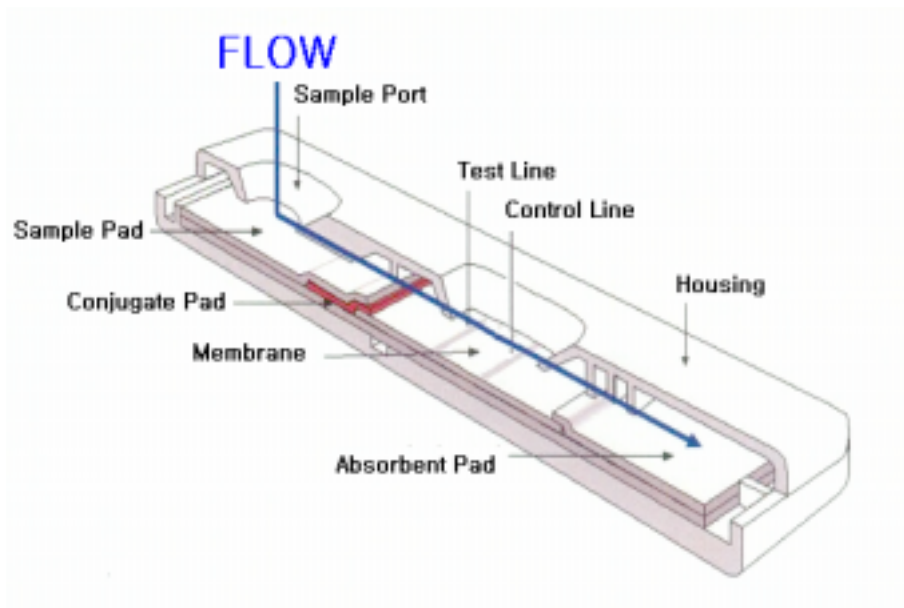


Figure 26. 진단 kit의 구성도

2) *Campylobacter* 진단키트의 효능평가

가) 표준물질의 설정 및 육안 판정예

(1) 양성표준물질

- o Bolton broth에 *Campylobacter jejuni*를 접종한 후 37℃에서 24시간 배양한 것으로 규정하였다.



Figure 27. 양성표준물질을 적용하여 양성 결과가 나온 경우

(2) 음성표준물질

- o Bolton broth에 아무것도 접종하지 않거나 *C. jejuni* 외에 다른 균주를 접종한 후 37°C에서 24시간 배양한 것으로 규정하였다.



Figure 28. 음성표준물질을 적용하여 음성 결과가 나온 경우

나) 제품의 특이성 검사

- o 음성 표준물질을 100 μ l씩 각기 30개의 진단 kit에 적용 후 아래와 같은 공식을 적용하여 결과를 산출하였다.

$$\begin{aligned} \text{특이도} &= \frac{\text{음성반응 kit 수 (30)}}{\text{양성반응 kit 수 (0) + 음성반응 kit 수 (30)}} \times 100(\%) \\ &= \% \end{aligned}$$

다) 제품의 민감성 검사

- o 양성 표준물질을 100 μ l씩 각기 100개의 진단kit에 적용 후 아래와 같은 공식을 적용하여 결과를 산출하였다.

$$\begin{aligned} \text{민감도} &= \frac{\text{양성반응 kit 수 (91)}}{\text{양성반응 kit 수 (91) + 음성반응 kit 수 (9)}} \times 100(\%) \\ &= 91\% \end{aligned}$$

라) 제품의 재현성 검사

- o 서로 다른 3명(A, B, C)의 시험자가 20개의 진단 kit로 민감성, 특이성 검사를 실시하였으며, 이들의 결과는 모두 동일하게 나왔으므로 재현도는 100%로 판단된다.

마) 제품 반응시간 검사

- o 각 표준물질을 100 μ l씩 20개의 진단 kit에 투여하여 결과가 나오기까지 (대조선 및 검사선의 색이 확연해져 육안으로 명확히 판명될 때)의 시간을 초단위로 환산하였다. 각각의 반응시간을 측정 (평균반응시간)하여 10분 이내이면 합격으로 판단하였다.

$$\begin{aligned} \text{평균반응시간} &= \frac{\text{20개 각각의 반응시간의 합(100 min)}}{20} \end{aligned}$$

5분이 경과한 후 결과를 판독하는 것이 적절할 것으로 판단된다.

제 4 절. 고성능 진단 kit의 제품화

1. 진단시스템설계

가. Immunichromatography kit의 제조

1) Colloidal gold 용액의 제조

- 가) 세제와 유기용매등으로 완전히 수세된 삼각플라스크에 DW 94 ml을 넣고 hotplate에서 가열하면서 약 50°C가 되면 1%(w/v) gold chloride 용액을 1 ml 첨가하였다.
- 나) 약 95°C가 되면 0.2%(w/v) trisodium citrate 용액 5 ml을 신속히 혼합하였다.
- 다) 반응용액의 색깔이 노란색, 검은색, 보라색을 거쳐 최종적으로 맑은 선홍색으로 변하면 실온에서 30분간 반응시켰다.
- 라) 0.1 M potassium carbonate를 이용해 pH 7.0으로 조정하였다.
- 마) 500~540 nm에서 흡광도를 측정하였다. (528 nm에서 peak를 나타내면 이상적인 40 nm gold)

2) Salt titration

- 가) Colloidal gold particle은 제조시마다 크기나 형태에서 차이가 나타날 수 있어 이들을 안정화시키는데 필요한 최소량의 항체 농도를 결정하는 것이 필요하였다.

Table 14. Colloidal gold 용액의 안정화를 위한 항체 최소농도 측정을 위한 salt titration

Reagents	Volume(μ l) of reagents added into each tube									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Colloidal gold solution	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Antibody solution (0.2 mg/ml)	0	5	10	15	20	25	30	35	40	50
Deionized water	50	45	40	35	30	25	20	15	10	0

- 이를 tapping하여 30분 정치한 후 10%(w/v) NaCl 용액을 각 시험관에 40 μ l씩 혼합하고 육안으로 색깔변화가 없는(파란색으로 변하지 않은) 최소 항체 농도를 결정하였다.

3) 항체 conjugation

- 가) Colloidal gold 용액 40 ml에 antibody 용액(0.2 mg/ml in 2mM borax) X ml을 한 방울씩 천천히 혼합한 후 30분 동안 invert shaking을 실시하였다. antibody 주입량은 salt titration에서 결정된 농도를 기준으로 결정하였다. (예: 최소항체 농도가 5번, 즉 항체가 20 μ l 투여된 농도에서부터 농도변화가 없었다면 1000:20 = 40:X 이므로 0.8 ml을 주입하여 gold colloidal 용액과 혼합하였다.)
- 나) 0.1%(w/v) NaOH를 사용하여 conjugation 용액의 pH를 9.0으로 조정하고, 0.4 ml의 10%(w/v) BSA를 한 방울씩 떨어뜨린 후 30분 동안 invert shaking하였다.(Blocking)
- 다) 0.1%(w/v) HCl을 이용하여 pH 7.2로 재조정 후 원심분리하여(10,000rpm, 1 hr) 상층액을 제거하였다.
- 라) Pellet을 2 mM borax 용액에 부유시켜 같은 조건으로 원심분리하고 상층액을 제거하였다.
- 마) 0.3 ml의 10% BSA, 3 ml의 1%(w/v) sodium azide, 26.7 ml의 2 mM borax(pH 7.2)가 혼합된 용액(총 30 ml)에 pellet을 완전히 부유시킨 후 냉장보관하였다.

4) Sample pad의 전처리

- 가) 2.5 ml의 20X PBS, 5 ml의 10% BSA, 2.5 ml의 10%(v/v) Tween-20을 혼합하여 DW로 최종 50 ml가 되도록 조정하고 이를 sample pad(20×30 cm)에 적신 다음 37°C incubator에서 하루동안 건조시켰다.

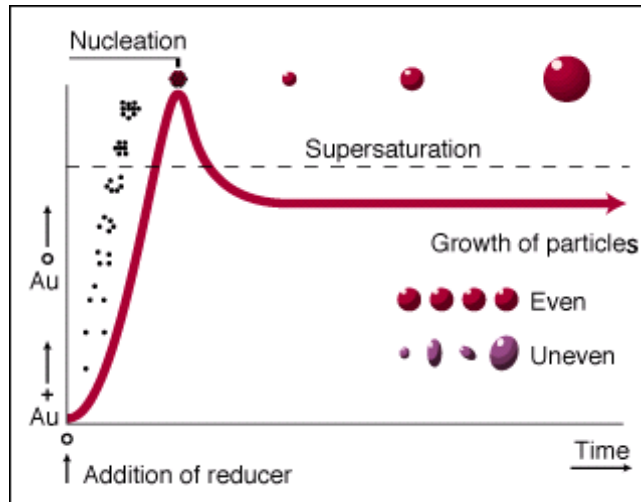


Figure 29. Gold conjugation

5) Conjugation pad 전처리

가) 5 ml의 20mM borax, 5 ml의 50%(w/v) trehalose, conjugation된 colloidal gold 용액 12.5 ml, DW 27.5 ml을 혼합하여 conjugation pad(20×30 cm)를 적셨다. 가장자리에 농도가 높아지는 edge effect를 방지하기 위해 dryer로 신속히 건조시켰다.

6) Test line 항체 농도 및 버퍼 조성조사

가) 양성 항원액과 음성 항원액을 제조한다.

나) Test line에 사용될 항체의 최적 농도를 알기 위해 항체를 10 mM phosphate buffer를 이용해 6 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml등으로 희석한 다음 각각 NC membrane에 1 μl씩 떨어뜨려 half strip을 제작하였다.

다) 항체를 부유시킬 buffer 조성을 설정하기 위해 NC membrane의 control line에 anti mouse-IgG(1 mg/ml in 10 mM phosphate buffer)를 1 μl 떨어뜨리고 test line 에는 항체(농도는 위 단계에서 결정)와 다양한 농도의 BSA(1%, 0.67%, 0.33%, 0.11%)를 혼합하여 1 μl 떨어뜨려 half strip을 제작하였다.

라) 각각의 half strip은 96 well plate(flat bottom)를 이용하여 conjugated colloidal gold 용액 2 μl, PBS(10 mM Na₂HPO₄, 3mM KH₂PO₄, 123 mM NaCl, 20 mM NaN₃)에 1% BSA, 0.5%(v/v) Tween 20을 첨가한 용액 40 μl, 항원액 약 8 μl를 혼합한 총 50 μl에 반응시켰다.

7) 면역크로마토그래피 키트의 조립

가) 전처리가 완료된 각각의 membrane들은 서로 겹쳐지도록 조립하여 backing card로 각 membrane들을 지지하였다. 조립된 membrane은 폭 4mm정도로 절단하였다.

나. Kit의 구성

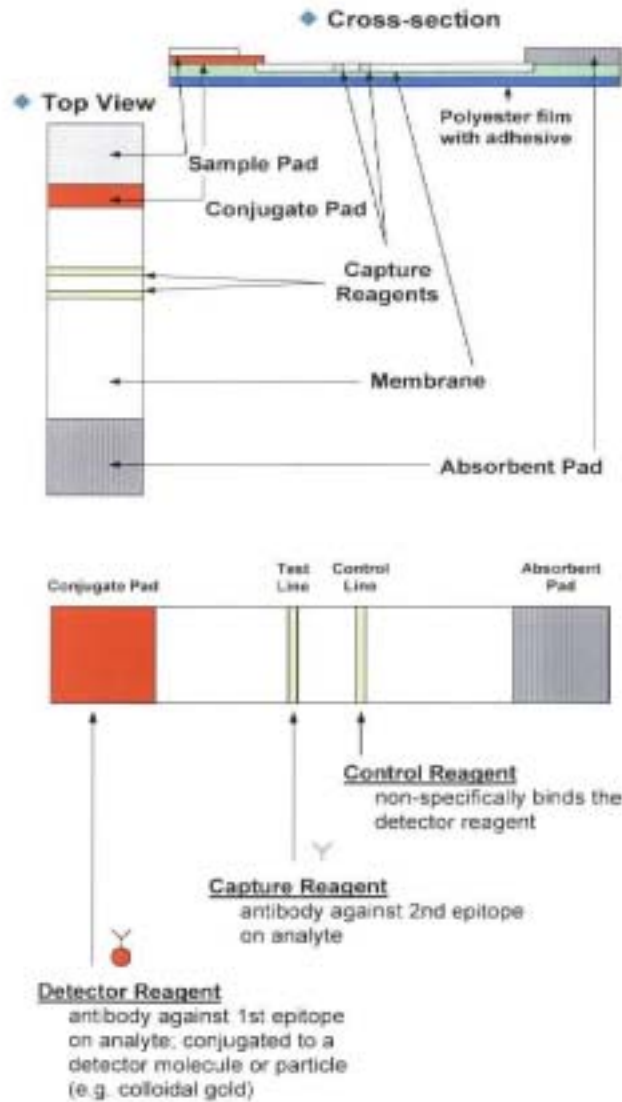


Figure 30. Kit의 도식



Figure 31. 완성된 pad

- 1) 흡수지 (absorbent pad) $6\pm 0.6\text{mm} \times 20\pm 2\text{mm}$
가) 백색의 셀룰로오즈 막 (cellulose membrane), 흡습성이 좋음.



Figure 32. Absorbent pad

- 2) 샘플패드 (sample pad) $6\pm 0.6\text{mm} \times 20\pm 2\text{mm}$
가) 백색의 셀룰로오즈 막 (cellulose membrane)으로 흡습성이 좋으며, 단백질 결합력이 매우 약함. 적량의 Tris 완충액을 흡수시킨 뒤 건조시켜 제조에 이용.

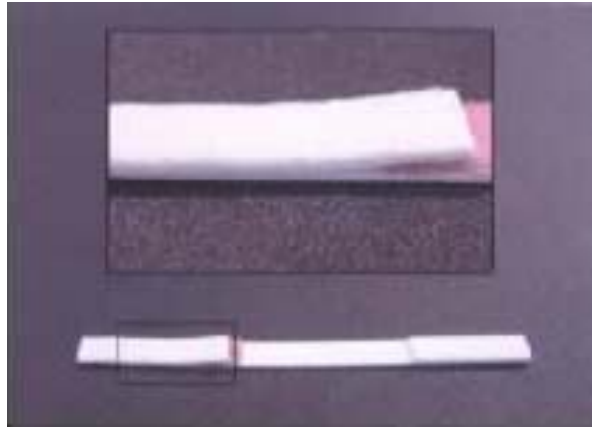


Figure 33 Sample pad

- 3) 금콜로이드 흡착패드 (gold-colloid conjugate pad) $6\pm 0.6\text{mm} \times 6\pm 0.6\text{mm}$
 가) 백색의 유리섬유소재 (glass fiber)로서 흡습성이 좋으며, 단백질 결합력이 매우 약함.
 나) 금콜로이드 흡착시 금콜로이드색에 의해 적색으로 변함.

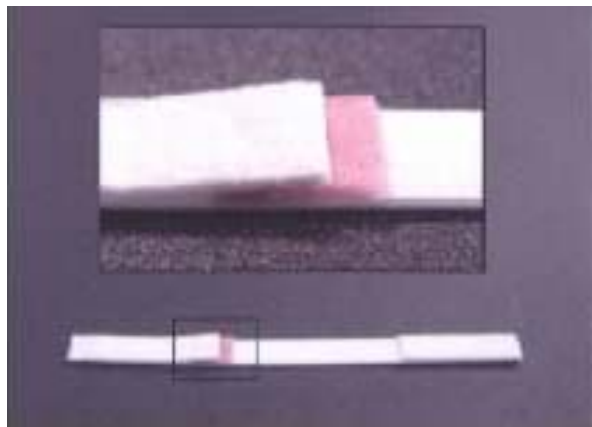


Figure 34. Gold-colloid conjugate pad

- 4) 단 클론 항-인간항체 융합 금콜로이드 혹은 단 클론 항-표적 단백질 융합
 가) 금콜로이드 (anti-human antibody MAb conjugated gold-colloid, anti-targer protein MAb conjugated gold-colloid) $50\pm 5\mu\text{l}$
 나) 40 nm 전후 크기의 금입자를 가지는 콜로이드 용액에 해당 단클론 항체를

흡착시켜 이용. 적색을 띤.

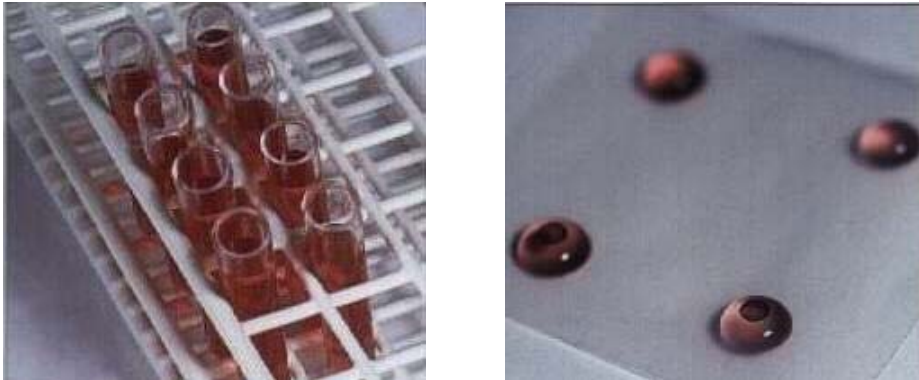


Figure 35. Gold conjugation

- 5) 나이트로셀룰로오즈 막 (nitrocellulose membrane) $6\pm 0.6\text{mm} \times 25\pm 2.5\text{mm}$
가) 백색으로 샘플과 반응한 금콜로이드가 진행하기에 적당한 미세한 공간크기(pore size)를 가지고 있으며, 단백질과의 결합력이 우수하여 적당한 농도의 항체용액을 바른 뒤 완전히 건조시키면 항체를 일정한 위치에 고정시킴. 플라스틱 필름에 코팅된 형태로 사용됨.

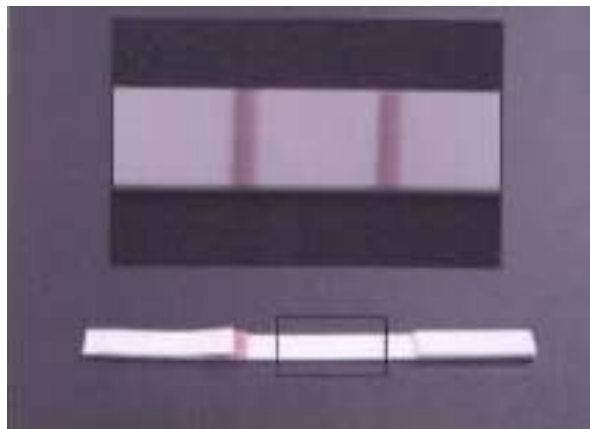


Figure 36. nitrocellulose membrane

6) 대조선 (control line)

- 가) 항 마우스면역글로불린 (anti-mouse IgG) $5\pm 0.5\mu\text{g}$
- 나) 무색의 항 마우스면역글로불린 (anti-mouse IgG)을 바른 선으로 적색의 금콜로이드와 반응하여 적색을 갖게 됨. 적절하게 반응이 이루어졌는가에 대한 판단선으로서 기능함.

7) 검사선 (test line)

- 가) 해당 표적단백질 혹은 단클론 항체 $5\pm 0.5\mu\text{g}$
- 나) 양성 반응 시 적색의 금콜로이드 (gold-colloid)와 반응하여 적색을 띠게 되며, 음성 반응시 금콜로이드 (gold-colloid)와 반응하지 아니하므로 무색을 유지하여 감별선으로서 기능함.

8) 폴리에스테르필름 (plastic backing)

$6\pm 0.6\text{mm} \times 62\pm 6.2\text{mm}$

- 가) 한쪽 면에만 접착제가 처리되어 샘플패드, 금콜로이드 흡착패드, 흡수지, 나이트로셀룰로오즈막 등을 고정해주는 역할을 하는 지지막. 흡착된 접착제는 다른 원료들과 접착반응 이외의 반응을 하지 않으며 필름 자체의 흡습성도 없음.

9) 플라스틱 케이스

- 가) 백색의 플라스틱 케이스 여과체 (다공성 플라스틱 섬유)

다. Kit의 제조공정

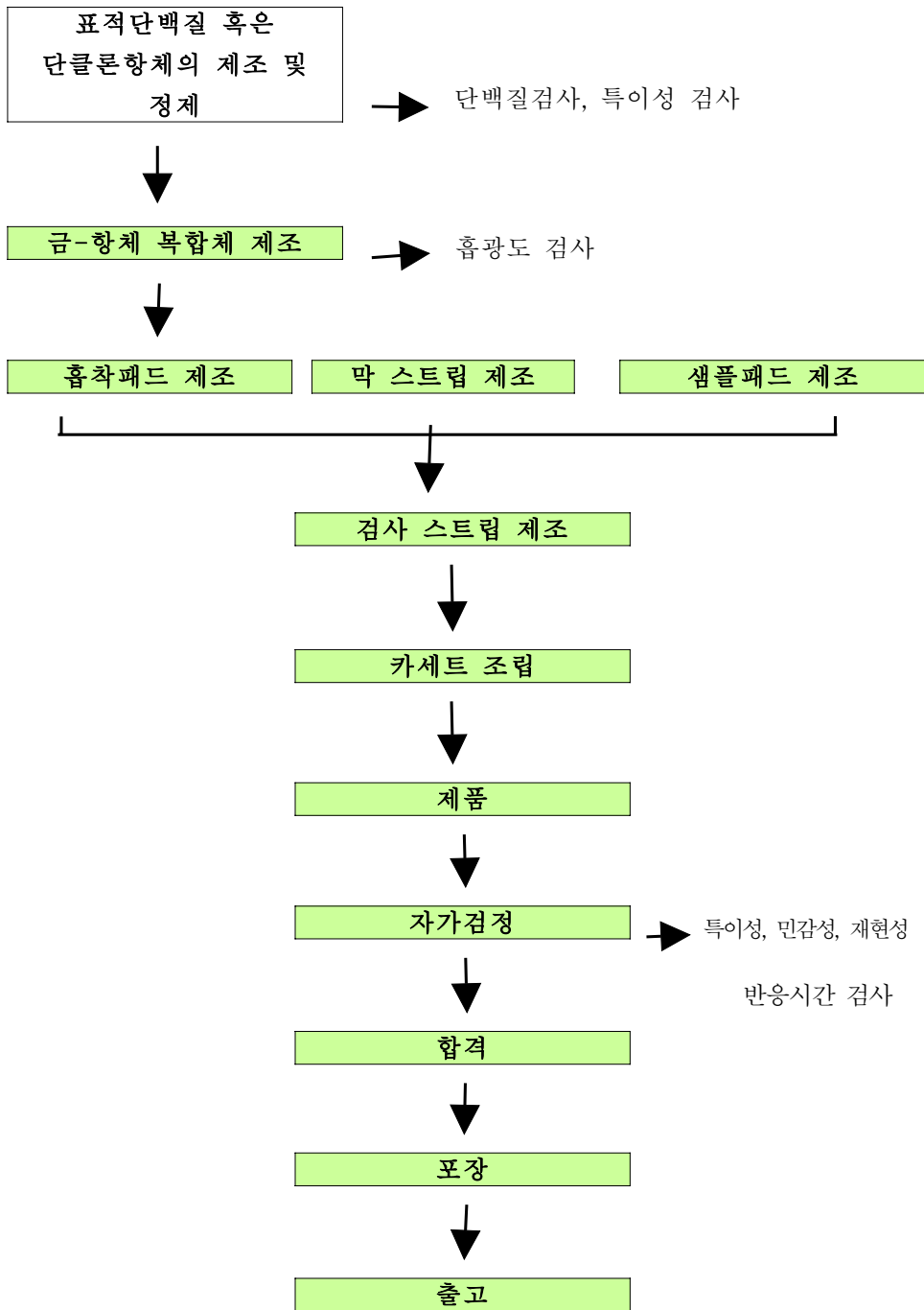


Figure 37. Kit의 제조공정

제 5 절. 진단 kit의 유효성 평가

1. Kit의 검정(Quality Control)

가. kit의 표준물질 설정 및 검정

1) 표준물질의 설정

(가) 양성표준물질

- o *Campylobacter jejuni*가 접종된 Bolton broth를 사용하였다.

(나) 음성표준물질

- o 균이 접종되어 있지 않거나 *Campylobacter jejuni*가 아닌 다른 균이 접종된 Bolton broth를 사용하였다.

나. 제품의 특이성 검사

- o 음성 표준물질을 100 μ l씩 각기 20개의 진단 kit에 적용 후 아래와 같은 공식을 적용하여 결과를 산출하였다.

$$\text{특이도} = \frac{\text{음성반응 kit의 수}}{\text{양성반응 kit의 수} + \text{음성반응 kit의 수}} \times 100 (\%)$$

다. 제품의 민감성 검사

- o 양성 표준물질을 100 μ l씩 각기 20개의 진단kit에 적용 후 아래와 같은 공식을 적용하여 결과를 산출하였다.

$$\text{민감도} = \frac{\text{양성반응 kit의 수}}{\text{양성반응 kit의 수} + \text{음성반응 kit의 수}} \times 100 (\%)$$

라. 제품의 재현성 검사

- o 서로 다른 3명(A, B, C)의 시험자가 20개의 진단 kit로 민감성, 특이성 검사를 하여 아래와 같은 공식을 적용하여 오차율을 계산함으로써 결과를 산출하였다.

$$\text{재현도} = A \text{ 민감도} - B \text{ 민감도}, A \text{ 민감도} - C \text{ 민감도}, B \text{ 민감도} - C \text{ 민감도} \\ A \text{ 특이도} - B \text{ 특이도}, A \text{ 특이도} - C \text{ 특이도}, B \text{ 특이도} - C \text{ 특이도}$$

마. 제품의 반응시간 검사

- 각 표준물질을 100 μ l씩 20개의 진단 kit에 투여하여 결과가 나오기까지 (대조선 및 검사선의 색이 확연해져 육안으로 명확히 판명될 때)의 시간을 초단위로 환산한다. 각각의 반응시간을 측정 (평균반응시간)하여 10분 이내이면 합격으로 판단하였다.

$$\text{평균반응시간} = \frac{\text{20개 각각의 반응시간의 합}}{20}$$

2. 평가 대상 및 검사과정

- 본 연구에서는 본 과제에서 개발한 rapid test kit를 평가하기 위해 순수한 균체액 혹은 spiked sample을 이용한 민감도 평가, 순수한 균주 배양액을 이용한 특이도 평가, 인위적으로 접종된 식품을 이용한 검사과정의 유효성 평가, 시중 유통 식품검체를 이용한 field test 그리고 장시간 안정성 평가를 수행하였다. 식품검체를 이용한 유효성 평가 및 field test의 경우 비교평가를 위해 축산물 가공 처리 기준 및 성분규격 시험법을 이용한 검사를 병행하였으며, reference method로서 면역자기분리법(immuno-magnetic separation)을 이용한 배양분리법으로 검사를 병행하였다.

가. 검사과정 및 실험방법

1) Rapid test kit 검사과정

- 검체 100 μ l를 검체투입구에 떨어뜨리고 10분이 지난 후에 결과를 육안으로 판정한다. 대조선 지역에 붉은 선이 나타날 경우에만 결과가 유효하다.

2) 외국 발매 제품

- 본 연구에서는 외국 발매 제품인 Merck사의 siglepath *Campylobacter*를 상대로 비교 평가를 수행하였다. 이 제품들은 면역크로마토그래피의 원리를 이용한 rapid test인데, Reveal의 경우 detector reagent로 본 연구의 rapid test와 유사하게 colloidal gold conjugate를 이용하는 반면 VIP의 경우 detector reagent로 항체가 코팅된 latex particle을 이용한다. 평가 시 각 제품의 사용설명서에 따라 검사를 수행하였다.

3) 축산물 가공 처리 기준 및 성분규격

- o 식품검체를 이용한 유효성 평가 및 field test에서 rapid test와 축산물 가공처리 기준 및 성분규격의 *Campylobacter* 시험법에 따른 검사를 병행하여 비교평가를 하였다. Rapid test에 사용된 동일한 증균배양액을 mCCDA 평판배지에 희석하여 37°C에 48시간 동안 배양한 후 무색집락균을 취하여 Brucella 평판배지에 희석하여 37°C에서 48시간 배양하였다. *Campylobacter*에 특징적인 성장을 보인 집락을 현미경으로 확인한 다음, Hippuric acid, Indoacetate hydrolysis 등의 생화학적 tests를 실시하였고, *Campylobacter* PCR를 실시하여 *C. jejuni*와 *C. coli*를 확인하였다.

나. 순수한 균체액 혹은 spiked sample을 이용한 민감도 평가

- o *Campylobacter* 균주를 Brucella 플레이트에 48시간 배양한 후 1루프를 취하여 인산완충용액 (PBS)에 부유시키고, brucella agar에 count를 실시하여 균농도를 측정하였다. 균을 부유시킨 인산완충용액을 10분 동안 끓여 살균한 후, bolton broth 배지에 여러 농도로 부유시켜 검체를 준비하였다. 각 농도의 검체를 rapid test, 및 singlepath *Campylobacter* 등을 상대로 민감도를 조사하였다.
- o 한편 위와 동일한 과정으로 균을 함유한 인산완충용액을 준비한 후 식품의 증균배양액에 희석하여 spiked sample을 준비하고 이를 rapid testsinglepath *Campylobacter* 등을 상대로 조사하였다. 이 때 축산물 가공 처리 기준 및 성분규격의 표준배양분리법으로 *Campylobacter*에 대하여 음성임을 확인한 식품만을 사용하였다.

다. 인위적으로 접종된 식품을 이용한 검사과정의 유효성 평가

1) 접종균 준비

- o *Campylobacter*를 Brucella broth에서 24~48시간 동안 배양한 후 배양액을 15,000xg에서 10분동안 원심분리하였고, cell pellet을 멸균된 PBS에 부유. PBS의 첨가로 흡광도를 $A_{640}=0.5$ (약 10^7 cell/ml)로 조정 한 후, PBS에 10배씩 희석하여 예상농도가 100 CFU/ml과 10,000CFU/ml인 접종용 세포부유액을 준비. 한편 세포부유액에 대하여 brucella agar로 viable plate count를 실시하여 실제 생균수를 측정하였다.

2) 식품 검체의 접종

- 평가에 이용한 식품은 생닭, 다진 쇠고기, 다진 돼지고기, 치킨가공(냉동)식품, 상추, 무, 그리고 우유 등 7종이었으며, 각 식품에 대하여 25g 혹은 25ml에 검체를 준비하여 *Campylobacter* 부유액 100 μ l를 접종하였다. 이렇게 각 식품에 대하여 접종하지 않은 음성 대조 검체, 저농도 오염 검체 (10cfu/25g sample) 그리고 고농도 오염 검체 (1,000cfu/25g sample)를 준비하였다. 한편 평가에 이용한 식품 중 변질된 검체를 제외하기 위해 각 식품 검체를 PBS에 부유시킨 후 희석 후 brucella agar로 viable plate count를 실시하여 background 미생물의 농도가 10³cfu/g 이하인 식품 검체만을 사용하였다.

3) 증균 배양 및 검사

- 항생제(Cefoperazone 10mg, Vancomycin 10mg, Trimethoprim 10mg, Cycloheximide 25mg/ L)와 5% Horse blood를 첨가한 Bolton broth에 넣은 다음, 미호기성조건(5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂)하에 37°C에서 4시간 배양시키고 이후 supplement를 추가하여 42°C에서 48시간 배양시킨 부유액을 항생제(cefoperazone 32mg, Amphotericin B 10mg)를 첨가한 mCCDA(Modified *Campylobacter* Charcoal Differential Agar)에 접종한다음 미호기적 조건에서 37°C, 48시간 배양하였다. Stomacher bag을 약하게 흔든 후 배양액을 취하고, 10분 동안 끓여 살균처리 하였다. 이와 같이 준비한 검체를 rapid test, Reveal, VIP, 축산물 가공 처리 기준 및 성분규격 시험법 그리고 면역 자기분리(immunomagnetic separation)를 이용한 분리배양법으로 소정의 과정에 따라 검사하였다.

라. 유통 식품을 이용한 field test

- 7종의 식품(생닭, 다진 쇠고기, 다진 돼지고기, 치킨가공(냉동)식품, 상추, 무, 그리고 우유)을 대상으로 각 식품 중에 따라 시중에 유통되는 시료 10개를 무작위로 구입하였다. 각 시료 25g을 이용하여 증균배양을 실시하고, rapid test 및 축산물 가공 처리 기준 및 성분규격 시험법을 이용한 분리배양법으로 소정의 과정에 따라 검사를 실시하여 field test를 수행하였다.

마. 장시간 안정성 평가

1) 검체

- o *Campylobacter* 균주를 Brucella agar 플레이트에 48시간 배양한 후 1루프를 취하여 인산완충용액 (PBS)에 부유시키고, brucella agar를 사용하여 plate count를 실시하여 균농도를 측정하였다. 균을 부유시킨 인산완충용액을 10분 동안 끓여 살균한 후, bolton 배지에 부유시켜 양성대조 검체를 준비하였으며, 검체를 vial을 녹여서 이용하였다.
- o 양성대조 검체 내 *Campylobacter*의 농도는 rapid test의 경우 최대 line intensity (OD_{max})의 50% 수준의 line intensity를 보인 항원 농도인 6×10^5 cell/ml로 사용하였다.
- o 음성대조 검체를 제조하기 위해 *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Esherichia coli* O157:H7 ATCC 43888, *Esherichia coli* O157:H7 ATCC 43890, *Esherichia coli* ATCC 9873, *Esherichia coli* ATCC 25922, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313, *Shigella flexneri* ATCC 12026, *Salmonella paratyphi* ATCC 11511, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Salmonella newport* ATCC 6962, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella london* ATCC 8389, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Citrobacter freundii* ATCC 6750, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Stapylococcus aureus* ATCC 25923 등을 위와 동일한 방법으로 세포를 준비한 후, 각 균의 농도가 10^7 cell/ml이 되도록 동일비율로 혼합하여 bolton 배지에 부유시켰다. 음성대조 vial에 분주하여 나눈 후 검체를 사용 전까지 -70°C 에 보관하였다. 각 검사 시 새 vial을 녹여서 이용하였다.

2) Rapid test

- o Rapid test kit를 4°C , 25°C , 40°C 등 3가지 온도에서 보관하였으며, 2주 간격으로 양성대조 검체 및 음성대조 검체를 이용하여 검사를 수행하였다. 이 때 양성대조 검체 및 음성대조 검체를 각각 3회 반복 검사하였다. Densitometer를 이용하여 각 test의 검사선의 line intensity (integrated optical density)를 정량하였다.

3. 연구 결과

가. 민감도 평가

- 1) *Campylobacter*의 6종(*Campylobacter jejuni* ATCC 33560, *Campylobacter coli* ATCC 33559, 임상분리균주 2주, 축산물분리균주 2주)의 순수한 균 부유액을 이용하여 rapid test의 민감도를 조사한 결과, rapid test의 검출한도는 1×10^5 cell/ml인 것으로 나타났다. 이와 같은 검출한도는 조사한 *Campylobacter* 6종간의 큰 차이가 관찰되지 않았다.
- 2) *Campylobacter jejuni* ATCC 33560을 생닭, 다진 쇠고기, 다진 돼지고기, 치킨가공(냉동)식품, 상추, 무, 그리고 우유 등 7종류의 식품의 증균배양액에 부유시킨 spiked sample을 이용하여 검사한 결과, rapid test에서 식품 종류에 따른 line intensity의 차이를 관찰하였으나 유의한 수준이 아니었으며, 검출한도도 1×10^5 cell/ml로 순수배양액과 동일한 것으로 판단되었다. 식품의 종류에 따른 line intensity의 차이는 증균배양액의 점도에 따른 전개속도의 변화 및 이에 따른 실질 반응시간의 차이, 그리고 식품 성분의 blocking 효과의 차이에 기인한 것으로 추정된다. 한편 식품의 음성 검체에서 비특이 반응을 관찰하지 않았다.
- 3) 외국 rapid test 제품인 Merck사의 singlepath *Campylobacter*로 동일한 검사를 실시한 결과, 검출 한도가 10^5 cell/ml로 본 과제에서 개발한 rapid test와 유사한 것으로 나타났으며, 이들 rapid test 제품도 식품 종류에 따라 line intensity가 다소 차이가 났으며, 식품에 따른 비특이반응이 관찰되지 않았다.
- 4) 결론적으로 본 과제에서 개발한 rapid test는 각 10^5 cell/ml의 검출한도를 보였는데, 이는 비교 평가한 외국의 제품과 동등 이상의 수준이다. 일반적으로 저농도로 오염된 식품의 증균배양 후에 *Campylobacter*의 생균수는 10^6 - 10^8 cell/ml 수준이며, 따라서 위와 같은 민감도는 식품 검사용 진단시약에 적합한 것으로 평가된다. 또한 식품 검체에 의한 영향을 조사한 결과, 다양한 종류의 식품에서 비특이 반응 혹은 민감도의 저하가 관찰되지 않았다. 따라서 본 과제에서 개발한 rapid test는 다양한 식품 중의 *Campylobacter*의 검출에 적합한 것으로 평가된다.

Table 15. *Campylobacter*의 순수배양액을 이용한 rapid test의 민감도 조사

검체	균 농도(cell/ml)에 따른 rapid test 결과 ^a							
	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	0
<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	++	++	+++	+++	+	-	-	-
<i>C. coli</i> ATCC 33559	++	++	+++	+++	+	+/-	-	-
임상분리균주 1	++	++	+++	+++	+	-	-	-
임상분리균주 2	++	++	+++	+++	+	+/-	-	-
축산분리균주 1	++	++	+++	+++	+	-	-	-
축산분리균주 2	++	+++	+++	+++	++	+/-	-	-

^a+++ , strong test line; ++, moderate test line; +, weak but distinct test line; +/-, very weak test line; -, no visible test line.



Figure 38. *Campylobacter*의 순수배양액을 이용한 rapid test의 민감도 조사

Table 16. *Campylobacter*로 spiking 한 식품중균배양액을 이용한 rapid test의 민감도 조사

식품검체	균 농도(cell/ml)에 따른 rapid test 결과 ^a							
	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	0
생닭	++	++	+++	+++	+	+/-	+/-	-
다진 소고기	++	+++	+++	+++	+	-	-	-
다진 돼지고기	++	++	+++	+++	+	+/-	-	-
치킨가공(냉동)식품	++	+++	+++	+++	+	-	-	-
우유	+	+++	+++	+++	+	-	-	-
상추	++	++	+++	++	+	+/-	-	-
무	++	++	+++	+++	+	-	-	-

^a+++ , strong test line; ++, moderate test line; +, weak but distinct test line; +/-, very weak test line; -, no visible test line.





Figure 39. *Campylobacter*로 spiking한 식품중균배양액을 이용한 rapid test의 민감도 조사

나. 특이도 평가

- 1) 본 과제에서 개발한 rapid test로 표준균주, 임상 및 축산분리균주 *Campylobacter* 30 균주, non-*Campylobacter* 20 균주 등의 순수배양액을 검사하여 특이도 조사하였다. Rapid test에서 조사한 *Campylobacter* 30 균주를 양성으로 판정하였다. 한편 non-*Campylobacter* 20 균주의 경우 음성반응을 보였다.
- 2) Merck 사의 singlepath *Campylobacter*의 경우도 표준균주, 임상 및 축산분리균주 *Campylobacter* 30 균주, non-*Campylobacter* 20 균주에서 양성반응이 보였으나, *Stapylococcus aureus* ATCC 25923에서 약한 양성반응을 보였다. 하지만 본 과제에서 개발한 rapid test는 기존의 발매제품과는 달리 *Stapylococcus aureus* ATCC 25923에서 위양성의 반응을 보이지 않았다.

Table 17. non-*Campylobacter* 균주를 이용한 rapid test의 특이도 조사

균주	검사 키트에 따른 결과	
	Rapid test	singlepath <i>Campylobacter</i>
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	-	-
<i>Esherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43888	-	-
<i>Esherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43890	-	-
<i>Esherichia coli</i> ATCC 9873	-	-
<i>Esherichia coli</i> ATCC 25922	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313	-	-
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12026	-	-
<i>Salmonella paratyphi</i> ATCC 11511	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	-	-
<i>Salmonella newport</i> ATCC 6962	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	-	-
<i>Salmonella london</i> ATCC 8389	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 193131	-	-
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	-	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 6750	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	-	+
<i>Stapylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	+

^a+++ , strong test line; ++, moderate test line; +, weak but distinct test line; +/-, very weak test line; -, no visible test line.

다. 검사과정의 유효성 평가

- 1) 본 과제에서 개발한 rapid test를 이용한 식품검사과정의 유효성을 평가하기 위해 생 닭, 다진 쇠고기, 다진 돼지고기, 치킨가공(냉동)식품, 상추, 무, 그리고 우유 등 7종의 식품에 *Campylobacter*을 저농도(약 10¹ cfu/25g 수준) 혹은 고농도(약 10³ cfu/25g 수준)로 인위적으로 접종하여 검사를 수행하였다.

2) Rapid test는 고농도로 오염된 70 검체 모두를 양성으로 판정하였다. 저농도로 오염된 검체에서 rapid test는 70 검체 중 68 검체를 양성으로 판정하였다. 또한 균을 접종하지 않은 음성 검체 70개를 모두 음성으로 판정하여 위양성이 관찰되지 않았다. 축산물 가공 처리 기준 및 성분규격 시험법으로 검사를 수행한 경우 저농도 접종 검체 70개 중 68개가 양성으로 판정되었으며, 고농도 접종 검체 70개 모두가 양성으로 판정되었다. 또한 음성 검체 70개 모두가 음성으로 판정되어 위양성을 관찰하지 않았다.

가) 본 과제에서 개발한 rapid kit과 축산물 가공 처리 기준 및 성분규격 시험법 등과 비교하면, 식품 중의 *Campylobacter*의 검출률(recovery rate)는 rapid test(98.6%, 138/140), 축산물 가공 처리 기준 및 성분규격 시험법(99.3%, 139/140) 순으로 높았다.

나) Rapid test에서 위음성이 나타난 것은 증균배양에서 *Campylobacter*의 성장이 rapid test의 검출한도인 약 10^5 cell/ml 이하 수준으로 성장하였기 때문인 것으로 추정되며, 축산물 가공 처리 기준 및 성분규격 시험법에서 위음성이 나타난 것은 증균배양액 내의 *Campylobacter*의 성장이 낮아 mCCDA 도말시 dilution out이 되거나 다른 세균보다 성장이 늦어 다른 균에 의해 플레이트 전체가 덮혔기 때문인 것으로 추측된다.

다) 위의 결과를 종합하면 본 과제에서 개발한 rapid test kit는 축산물 가공 처리 기준 및 성분규격 시험법과 비교하여 불패, 식품 중의 *Campylobacter*의 검출률이 비슷한 것으로 관찰되었다.

라) 한편 기존 발매제품으로 검사를 수행한 경우 같은 Immunochromatographic assay 방법을 사용한 Merck사의 singlepath *Campylobacter*는 본 과제에서 개발한 rapid test와 동일한 결과를 보인 반면 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923에 약한 위양성을 받을 보임으로 약간 떨어진 것으로 나타났다.

Table 18. Rapid test를 이용한 식품검사과정의 유효성 평가

식품검체	집중농도 (cfu/25g)	검체수	검사방법에 따른 양성판정 검체수	
			Rapid test	축산물 가공 처리 기준 및 성분규격 시험법
생닭	none(0)	10	0	0
	low(10)	10	10	10
	high(1000)	10	10	10
다진 쇠고기	none(0)	10	0	0
	low(10)	10	10	10
	high(1000)	10	10	10
다진 돼지고기	none(0)	10	0	0
	low(10)	10	10	10
	high(1000)	10	10	10
치킨가공(냉동) 식품	none(0)	10	0	0
	low(10)	10	10	10
	high(1000)	10	10	10
우유	none(0)	10	0	0
	low(10)	10	9	10
	high(1000)	10	10	10
상추	none(0)	10	0	0
	low(10)	10	10	10
	high(1000)	10	10	10
무	none(0)	10	0	0
	low(10)	10	9	10
	high(1000)	10	10	10

라. 유통 식품을 이용한 field test

- 1) 본 과제에서 개발한 rapid test의 식품 검사용 키트로서의 적합성을 평가하기 위해, 시중에 유통되는 생닭, 다진 쇠고기, 다진 돼지고기, 치킨가공(냉동)식품, 상추, 무, 그리고 우유 등 7종의 식품을 대상으로 각각 30 검체를 무작위로 구입하여 총 210 sample을 검사 수행하였다. 그 결과 생닭 30검체 중 23 검체에서 양성반응이 나왔다. 축산물 가공 처리 기준 및 성분규격 시험법에서는 22개의 검체에서 양성반응이 나와 rapid test kit의 민감도가 우수한 것으로 나타났다.
- 2) 외국 발매 키트의 경우 Merck사의 singlepath *Campylobacter*는 본 관제의 rapid test와 동일한 결과를 보였다.

Table 19. 시중 유통 식품검체를 이용한 field test

식품검체	검체수	검사방법에 따른 양성판정 검체수	
		rapid test	축산물 가공 처리 기준 및 성분규격 시험법
생닭	30	23	22
다진 쇠고기	30	0	0
다진 돼지고기	30	0	0
치킨가공(냉동)식품	30	0	0
우유	30	0	0
상추	30	0	0
무	30	0	0

마. 장기간 안정성 평가

- 1) 본 과제에서 생산한 rapid test의 유효기간을 평가하기 위해, 제조 직후의 활성을 기준으로 rapid test의 활성이 80% 이상의 수준으로 유지되는 기간을 유효기간으로 설정하여 안정성을 조사하였다. 현재에는 안정성 평가를 6개월째 진행 중이며, 이 기간

동안 rapid test는 안정한 것으로 관찰되었다.

- 2) Rapid test의 경우 4℃, 25℃, 40℃ 등 3가지 보관온도에서 모두 6개월 동안 초기 활성의 90% 이상의 활성을 유지하고 있다. 경험적으로 37℃-50℃의 가혹 조건에서 보관할 때의 유효기간은 일반적인 보관 조건에서는 약 3배 이상의 기간으로 환산되는 것으로 관찰하였으며, 이로부터 본 과제의 rapid test의 유효기간은 18개월 이상일 것으로 전망된다.

4. 결론

가. 본 연구에서는 본 과제의 수행으로 개발한 rapid test의 유효성 평가를 수행하였다. 다양한 균주를 이용하여 진단시약의 민감도 및 특이도 평가를 수행한 결과, 본 과제에서 개발한 rapid test는 각각 10^5 cell/ml수준의 뛰어난 민감도를 보였는데, 이는 외국의 발매제품과 비교할 때 동등 이상의 수준이었다. 또한 단클론항체를 이용하는 본 과제의 개발 진단시약은 *Campylobacter*과 유사항원을 지닌 균주와의 비특이 반응이 적어, 다클론항체를 이용하는 발매제품과 비교할 때 보다 개선된 균주 특이도를 보였다.

나. 식품검체를 이용한 유효성 평가에서 본 과제의 rapid test는 0.4 cfu/g(10 cfu/25g)과 40 cfu/g (1000 cfu/25g)의 *Campylobacter*으로 오염된 검체를 각각 98.6%(138/140)의 높은 비율로 검출하였다. 이는 외국의 발매제품과 비교할 때 동등 이상의 수준이며, 또한 미 농무부의 식품안전성 평가부 (USDA/FSIS)에서 제시한 민감도인 3 cfu/g을 능가하는 것으로 평가된다.

다. 접종된 식품검체 및 비접종 식품검체 등 총 350개의 검사결과를 종합하여 본 과제에서 개발한 진단시약을 이용한 식품검사과정을 축산물 가공 처리 기준 및 성분규격 시험법과 비교 평가하면, rapid test는 축산물 가공 처리 기준 및 성분규격 시험법 26.0%(91/350)로 같은 일치율을 보였다.

마. 결론적으로 본 과제에서 개발한 rapid test는 뛰어난 민감도와 특이도 및 외국제품과 비교할 때 동등이상의 성능, 표준 배양분리법과의 높은 일치도 등을 보여 식품의 대규모 검사에 적합한 것으로 평가된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
1차년도 (2003년)	<p><제 1 세부과제> 한국소비자보호원</p> <p>축산물 및 식품에 오염된 균주 분리 및 특성 파악</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 각 종 <i>Campylobacter</i> 균 수집 - 재래시장 및 대형할인매장에서의 판매 중인 축산물에 오염되어 있는 <i>Campylobacter</i> 균 분리 동정 - 미생물협회 등의 표준 균주 - 국내 병원의 임상분리균주 분양 및 분리 동정 • 생화적 방법 및 PCR 또는 real time PCR로 <i>Campylobacter</i> 동정 ○ 표준균주와 국내분리균주의 특성 비교분석 - PFGE를 통한 균주의 특성 - CadF 유전자 존재 PCR 확인 	100
	<p><제 1 협동과제> 서울대 박용호</p> <p>병원성 <i>Campylobacter</i> 특이 항원 제조 및 다클론 항체 제조</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 분리균주 이용 특이 항원대량생산 ○ 특이항원 제조 및 분석 연구 ○ 국내 분리균주 이용 특이항원 특성화 ○ 항체 규격 설정 ○ 다클론 항체 생산 제조 	100
	<p><제 2 협동과제> (주) RNL 생명과학</p> <p>다클론 및 단클론 항체 생산 공정확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 다클론 항체 생산 공정확립 ○ 단클론 항체 생산 공정확립 ○ 진단 system 설계 및 확립 	100

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
2차년도 (2004년)	<p data-bbox="352 443 595 562">< 제 1 세부과제 > 한국소비자보호원 서 정 희</p> <p data-bbox="360 611 619 770">진단 kit 유효성 평가 system 확립 / 축산물 안전확보를 위한 설문조사</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 진단 kit 유효성 평가 system 확립 ○ 검량선 제작 및 외국진단 kit의 특이성 및 민감도 조사 ○ 축산물 안전 확보를 위한 진단 kit에 대한 설문조사 <ul style="list-style-type: none"> - 대상: 국가기관, 기업, 학교 등 병원성 미생물 검사 담당자들 - 내용: 본 과제에 대한 홍보 및 <i>Campylobacter</i>의 위해성에 대한 인식, 개발되는 kit의 장점 및 외국제품보다의 우수성 등 	100
	<p data-bbox="373 1043 600 1115"><제 1 협동과제 > 서울대 박용호</p> <p data-bbox="341 1171 624 1308">병원성 <i>Campylobacter</i> 특이 단클론 항체 제조 및 특이성 분석 및 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 병원성 <i>Campylobacter</i> 단클론 항체의 개발 및 정제 <ul style="list-style-type: none"> - 단클론 항체 생성 하이브리도마의 개발 - 세포 융합 및 항체생성 융합세포의 클로닝 - 단클론 항체의 평가 및 선정 ○ 다클론 항체의 대량 생산 및 정제 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Campylobacter</i> 특이 염소 항혈청 생산 - 다클론 항체의 정제 <ul style="list-style-type: none"> . Ammonium sulfate 침전 . Immunoaffinity chromatography . 면역흡착을 이용한 비특이항체의 제거 	100
	<p data-bbox="384 1469 576 1529"><제 2 협동과제 > RNL생명과학(주)</p> <p data-bbox="336 1585 632 1655">Kit 구성시약 제조 및 kit 최적화 기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 구성시약 제조 및 제조공정확립 ○ 진단 kit formulation 및 kit 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - Dip-stick 형태 - Immuno-stick 형태 	100

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
3차년도 (2005년)	<p align="center">< 제 1 세부과제 > 한국소비자보호원</p> <p align="center">병원성 <i>Campylobacter</i> 진단 kit의 유효성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 표준균주 및 분리균주를 이용한 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 표준 균주 및 분리균주를 통한 검출한계 조사 ○ 인위적으로 접종된 식품을 이용한 유효성 평가 ○ 외국제품과의 성능비교 평가 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Campylobacter</i>를 인위적으로 접종된 식품을 이용한 유효성 평가 - 유통식품을 이용한 field test - 장시간 안정성 평가 - 민감도 평가 등 ○ 국내개발제품의 field 유효성 평가 ○ 국내에서 개발한 진단 kit의 현장 적용시험의 결과분석 	100
	<p align="center">< 제1 협동과제 > 서울대 박용호</p> <p align="center">특이적 단클론항체의 대량 생산 및 생산 공정 개선 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 특이적 단클론항체의 대량 생산 및 정제 <ul style="list-style-type: none"> - 마우스 복수를 이용한 단클론 항체 생산 - 세포배양 - IgG 항체의 정제 - IgM 항체의 정제 ○ 생산 공정 개선 연구 	100
	<p align="center"><제 2 협동과제 > RNL 생명과학(주)</p> <p align="center">병원성 <i>Campylobacter</i> 진단 Kit의 제품화</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Scale-up 연구 ○ 경제적인 진단 kit 생산공정 (고효율 저원가 공정) 확립 ○ 시제품 제작 	100

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 기술적 측면

가. 본 과제를 통하여 개발된 민감도나 특이성이 높은 제품의 생산기술은 기존 수입의 국제품 및 기술에 비하여 경쟁력이 높을 것으로 예상된다.

나. 각 부분의 전문인력을 보유한 연구기관들의 협력체제로 개발을 성공적으로 완수하여 저렴한 가격의 고성능 *Campylobacter* 진단 kit 공급이 가능할 것으로 판단됨.

다. 병원성 *Campylobacter* 특이항원 확보 및 항체 생산기술확보

- 1) 다클론 항체 및 단클론 항체의 대량생산기술확보와 생산된 항체의 특이성 검증기술 습득하게 됨.

라. 진단시약 개발기술확보 및 기술과급

- 1) 면역 크로마토그래피 기술을 이용한 rapid test kit 개발기술 확보하며, kit formulation 기술을 확보하였으며, 고정화 항체 및 효소표지 항체 접합체의 안정화기술 습득하였고, kit 대량 제조공정 개발 및 최적화 기술 확보와 확립된 연구기관의 실전적 경험 축적과 전문인력 양성 및 시스템 구축, 산학연 공동의 실전적 경험 보유 및 시스템 구축하게 됨.

마. 생산부터 소비자까지의 각 단계별 오염 *Campylobacter* 오염 정도를 파악하여 HACCP의 조기정착화에 기여하며 적절한 예방대책을 마련하는데 중요한 자료를 제공할 수 있음.

- 1) 도계장에서의 도계단계별 오염도 확인
- 2) 가검물의 부위별 오염도 확인
- 3) 시중에 유통중인 축산물에서의 오염도 확인

2. 경제·산업적 측면

가. 수입되고 있는 *Campylobacter* 검사시약의 수입 대체로 귀중한 외화절감

나. 본 과제 성공시 국내에 시판 중인 외국의 *Campylobacter* 진단 kit 제품은 비싼편에

속하나 이에 절반가격이하로 공급 가능할 것으로 예상되어 검사 비용절감 및 그에 따른 검사범위 확대 가능

다. 가격 경쟁력과 특이성과 민감도가 높은 국산시약의 개발로 수출 예상되며, 이에 따라 개발 기술까지 수출하게 되면 외화 획득으로 국가경제에 이바지 할 수 있을 것임.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 활용계획

- 본 연구를 통해 축산물위생과 인체감염에서 문제가 될 수 있는 국내 *Campylobacter* 균의 분포와 특성을 파악하고 국내분리주에 특이한 단클론 항체를 개발함과 동시에 신속진단기법을 확립하여 이로인한 식중독을 예방함과 동시에 소비자들에게 안전한 축산식품을 공급하는데 이바지하고자 하였다. 본 연구결과가 활용될 수 있는 방안은 다음과 같이 요약할 수 있다.

가. 농장에서 식탁까지의 축산물에 대한 *Campylobacter* 오염현황 파악; 정책 자료, 현장 적용

- 1) 도계장에서의 도계단계별 오염도 확인
- 2) 가검물의 부위별 오염도 확인
- 3) 시중에 유통중인 축산물에서의 오염도 확인

나. 개발된 신속진단 kit은 HACCP에 적용될 수 있음; 현장적용

- 1) 본 kit를 *Campylobacter* 균의 screening 용으로 사용하게 되면, 신속하고 정확하게 판별 가능하여 각 단계별로 중점적으로 오염원 관리를 할 수 있음.
- 2) 오염이 주로 이루어지는 단계를 파악함으로써 CCP 설정의 참고자료로 활용

다. 이러한 결과를 바탕으로 식품의 가공부터 소비 단계까지의 철저한 검증과 오염 정도를 정확하게 알아내어 축산물 및 식품에 대한 소비자의 신뢰를 쌓게 될 것임; 시책건의 및 정보제공

제 2 절 발표실적

1. 논문게제(국제 SCI 논문게제 1 편 게재, 2 편 투고, 2 편 투고준비)

가. Besser prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* spp. from cattle farms in Washington State. Applied and Environmental Microbiology. Jan. 2005. 71(1)169-174.

나. Dissemination of Clonal Strains of *Campylobacter coli* Resistant to Multiple Antimicrobial Drugs among Washington State and California Cattle. Appl. Environ. Microbiol. 2006, Submitted.

다. Prevalence of *Campylobacter* spp. and Their Antibiotic Resistance Isolated in 2001-2006 from Chicken Meat, Pork, and Beef in Korea, Journal of Food Protection. 2006. Submitted

라. pVir plasmid and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* Isolates from poultry, meat and human in Korea, International Journal of Antimicrobial agents, 2006, In preparation.

마. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for detection of *Campylobacter jejuni*, Journal of clinical microbiology, 2006, In preparation.

2. 학회 발표(국제학회 1 편, 국내학회 3 편)

가. pVir plasmid and tetracycline resistance of *Campylobacter jejuni* Isolates from poultry, meat and human in Korea, 대한수의학회, 2006, 한국

나. Association of antimicrobial resistance and PFGE genotypes of thermophilic

Campylobacter spp. isolated from cattle farms in WA and CA, Presented at the Conference of Research Workers in Animal Diseases, 2005, St. Louis, USA.

다. Detection of erythromycin resistance using by Single nucleotide polymorphisms in *Campylobacter*, 대한수의학회, 2005, 한국

라. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in meat, 대한수의학회, 2004, 한국

Prevalence and Antimicrobial Resistance of Thermophilic *Campylobacter* spp. from Cattle Farms in Washington State

Wonki Bae,^{1,2} Katherine N. Kaya,³ Dale D. Hancock,² Douglas R. Call,²
Yong Ho Park,¹ and Thomas E. Besser^{2*}

¹Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea, ²and Department of Veterinary Microbiology and Pathology³ and Field Disease Investigation Unit, Department of Clinical Sciences,³ Washington State University, Pullman, Washington

Received 28 April 2004/Accepted 22 August 2004

The prevalence of thermophilic *Campylobacter* spp. was investigated in cattle on Washington State farms. A total of 358 thermophilic *Campylobacter* isolates were isolated from 636 cattle sampled on 15 farms (eight dairies, two calf rearing farms, two feedlots, and three beef cow-calf ranches). Isolate species were identified with a combination of phenotypic tests, *hsp60* colony blot hybridization, and multiplex *hsp60* PCR. Breakpoint resistance to four antimicrobials (ciprofloxacin, nalidixic acid, erythromycin, and doxycycline) was determined by agar dilution. *Campylobacter jejuni* was the most frequent species isolated (34.1%), followed by *Campylobacter coli* (7.5%) and other thermophilic campylobacters (1.2%). The most frequently detected resistance was to doxycycline (42.5% of 350 isolates). Isolates from calf rearing facilities were more frequently doxycycline resistant than isolates from other farm types. *C. jejuni* was most frequently susceptible to all four of the antimicrobial drugs studied (28.9% of 232 isolates). *C. coli* isolates were more frequently resistant than *C. jejuni*, including resistance to quinolone antimicrobials (89.3% of isolates obtained from calves on calf rearing farms) and to erythromycin (72.2% of isolates obtained from feedlot cattle). Multiple drug resistance was more frequent in *C. coli* (51.2%) than in *C. jejuni* (5.8%). The results of this study demonstrate that *C. jejuni* is widely distributed among Washington cattle farms, while *C. coli* is more narrowly distributed but significantly more resistant.

Members of the genus *Campylobacter* have long been recognized as a cause of septic abortion in both cattle and sheep, but the development and improvement of selective *Campylobacter* culture media led to the recognition that campylobacters can be etiological agent of human gastroenteritis (50). *Campylobacter* species are among the most frequently identified bacterial causes of human gastroenteritis in the United States (37) and other industrialized countries. In the United States, an estimated 2.4 million cases of human campylobacteriosis occur each year (18). Furthermore, there has been an increase in the frequency of resistance to drugs that are important in the treatment of human campylobacter gastroenteritis, especially fluoroquinolones and macrolides. Some groups have suggested that the increase in resistance among human *Campylobacter* isolates is attributable to transmission of antimicrobial-resistant animal isolates to humans (45, 46, 51).

The chicken is the species most frequently identified as a reservoir of bacteria responsible for human infection. Case-control studies have identified a significant association between *Campylobacter* infection in humans and handling and consumption of poultry (3, 10, 12, 27, 43). However, other studies have reported an association with cattle (2, 8, 19, 28–30,

41, 53, 54, 59, 61). Direct-contact exposure to bovine feces and ingestion of unpasteurized bovine milk are well-documented causes of outbreaks of campylobacteriosis (16, 44, 59). Recently, Fitzgerald et al. reported a high degree of genetic relatedness between the campylobacters from cattle and humans in the same geographical area (17). Because of the potential linkage between *Campylobacter* spp. harbored by cattle and human disease, in this study we investigated the prevalence, distribution, and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and other thermophilic *Campylobacter* (OTC) species in cattle.

MATERIALS AND METHODS

Farm visits. Fifteen cattle herds situated in the northwestern United States were selected for cross-sectional studies, including eight dairy herds, two calf rearing farms, two feedlots, and three beef cow-calf ranches based on the approximate proportion of each cattle farm type in the industry in Washington State. From February 2002 to April 2003, each operation was sampled twice at 6-month or longer intervals in order to increase the probability of *Campylobacter* sp. isolation.

Samples. On each farm visit, duplicate samples of fecal or free fecal droppings were obtained from all animals as follows: dairy farms and beef cow-calf ranches, calves 2 to 4 weeks old ($n = 10$) and adult recently birth cows ($n = 20$); dairy calf rearing, calves 2 to 4 weeks old ($n = 40$); feedlots, cattle at 10 ($n = 20$) and 30 ($n = 20$) days on feed.

Isolation and preservation of *Campylobacter* species. Individual fecal specimens (20 g in 50-ml sterile plastic tubes) were collected from cattle and transported for processing within 4 h of the time of sampling. At the laboratory, a subsample (approximately 8.1 g) of each fecal specimen was inoculated into Campy-Thioglycolate medium (5.16% agar supplemented with streptomycin, neomycin,

* Corresponding author. Mailing address: Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University, Pullman, WA 99164-7040. Phone: (509) 335-5875. Fax: (509) 335-8528. E-mail: tbesser@vetmed.wsu.edu.

pVir plasmid and tetracycline resistance of *Campylobacter jejuni* isolates from poultry, meat and human in Korea

Jun-Lin Lee, Won-Bae Hong, Hye-Chung Lee, Se-Hyun Lee, Woo-Eung Jung, Young-Eung Park, Sun-Young Hwang, Seok-Jin Jeon, Eui-Suk and Yong-Ho Park

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University and Research Institute for Consumer Safety Center, Korea Consumer Protection Board

Introduction

The plasmid pVir may play a role in the virulence of *Campylobacter jejuni*, a major foodborne pathogen and leading cause of bacterial gastroenteritis. Bacon et al. suggested that the pVir plasmid is important *in vitro* for both adherence and invasion of intestinal epithelial cells in culture. Resistance to tetracycline in *Campylobacter* spp. has been reported in many countries. High-level tetracycline resistance is usually associated with the *tetO* gene carried on transmissible plasmids in *C. jejuni*. Little is known about pVir plasmid and tetracycline resistance in Korean *C. jejuni*. Therefore, we investigated the presence of pVir and tetracycline resistance in 104 *C. jejuni* isolates (36 from poultry, 5 from meat and 13 from human).

MATERIALS AND METHODS

1. Bacterial strains

104 strains of *Campylobacter jejuni* were collected between 2003 and 2005 from poultry (*n*=66), meat (*n*=5), and human (*n*=13).

2. Antimicrobial susceptibility testing

1) Disk diffusion methods (BD Ireland)

- tetracycline (30 µg), nalidixic acid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), erythromycin (15 µg)

2) Tetracycline MICs

- agar diffusion method (PCCLB)

3. Isolation and characterization of plasmids

1) Plasmid isolation: Qiagen Mini Plasmid Kit (Qiagen, Canada).

2) PCR for detection of pVir genes

- *amp^r*, *amp^r*, *amp^r*, *amp^r*, *amp^r*, *amp^r*

- Intron 1 control: 23F (EPA) of diarrhoeal *Campylobacter* spp. → 300-300 bp

- ICE conditions: initial denaturation at 95 °C for 1 min; 30 cycles of 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, followed by a final extension at 72 °C for 10 min.

3) PCR for detection of *tetO* gene

- Primer *tetO* = 550 bp

- ICE conditions: same as described above.

Table 1. Sequence of primers used

	Primer sequence
cp01	5'-AGGGCAAGGGCAAGAATAG-3'; 5'-CGAAAGATGTAGAGGGTGTGAA-3'
cp05	5'-GAACAGGAGTGGAAAACCTAGC-3'; 5'-TTCGTCATGGGCTATATG-3'
cp29	5'-AATGGCAAGTGAAGAAGAAAT-3'; 5'-ATAAGTCTATAATAAAA-3'
cp32	5'-ATACAGATCAAAATTCACACAGG-3'; 5'-ATAATTCGGCTACATTCCTG-3'
cp49	5'-ATCATAATGGCTTTTTCCTG-3'; 5'-TTTTGGGAAGATGTTAGAAAGTA-3'
Therm 6003	5'-TATTCATAATCCAACTTAGT-3'; 5'-GAAGATAACGGTGTCTATTTTG-3'
	5'-GGGCTTTTGTGTTATGGTGG-3'; 5'-ATGGACAACTCGACAGAGTCT-3'

4. Transfer of plasmids between *C. jejuni* strains

1) Donor & recipient

- Donor: *C. jejuni* strains having both a tetracycline-resistance plasmid and pVir

- Recipient: *C. jejuni* isolate (nalidixic acid-resistant, tetracycline-susceptible recipient strains with no plasmid)

2) Methods

- 0.5 ml of the donor culture + 1.0 ml of the recipient culture

- Incubation time: 0.25-100 µl per 100 µl recipient suspension (Canada), placed on brain heart infusion agar, and incubated for 24 h

- Excuspation in 1.0 ml of phosphate-buffered saline and dilution

- Inoculation on Mueller-Hinton agar containing 25 µg/ml tetracycline and 30 µg/ml nalidixic acid

RESULTS

Antimicrobial susceptibility

The antimicrobial resistance of 104 isolates of *C. jejuni* is shown in Table 2. Tetracycline MICs (32 to >256 µg/ml) were further determined in *C. jejuni* isolates which were identified as tetracycline-resistant by disk diffusion test (Table 3).

Table 2. Antimicrobial resistance of *C. jejuni* isolates (n=104) determined by antimicrobial disk diffusion

Antimicrobial agent	Resistant isolates (%)
Tetracycline	77 (74.0%)
Nalidixic acid	31 (29.8%)
Ciprofloxacin	9 (8.6%)
Erythromycin	4 (3.8%)

Table 3. Tetracycline MIC results of 77 tetracycline-resistant *C. jejuni* isolates

MICs (µg/ml)	No. of isolates
32	8
64	28
128	39
256	2

Plasmid content

The analysis of 104 *C. jejuni* strains revealed that 40% of them had the plasmid with size ranging between 8 and 58 kb. Tetracycline-resistance plasmids were found in 30 (51%) of 77 tetracycline-resistant isolates. 3 (30%) of 104 *C. jejuni* isolates contained pVir plasmid. Tetracycline-resistant plasmids were found in 2 (67%) of 3 pVir-positive *C. jejuni* isolates compared with 37 (37%) of 101 pVir-negative isolates. 35 (92%) of the 39 isolates that contained tetracycline resistance plasmids did not contain pVir, indicating that plasmid-mediated tetracycline resistance does not occur exclusively with pVir.



Fig. 1. PCR amplification of tetracycline-resistance *C. jejuni* strains. Lane 1, 100 bp ladder; 2, positive control strain *C. jejuni* ATCC 35069; 3, tetracycline susceptible strain C2 27; 4-8, C2L, C2H, C2B, C2D, C2E; and 9, negative control.

Conjugation of plasmids

The 20 tetracycline-resistant *C. jejuni* strains did not have the plasmid carrying the *tetO* gene were analyzed for the ability to transfer plasmid-encoded tetracycline resistance. Transfer frequencies ranged from 0.3×10^6 to 4×10^6 transconjugants per recipient in 6h mating. Recipient transconjugants were both tetracycline-resistant and nalidixic acid-resistant. The *tetO* gene was amplified from transconjugants from all successful matings. Tetracycline-resistant transconjugants contained 40 kb plasmid, did not carry *tetO* but were negative for pVir (data not shown). This finding confirmed that pVir could not be transferred with tetracycline-resistance plasmids in conjugal mating between *C. jejuni* strains (Bacon et al.).

Conclusion

- In this study, high level tetracycline resistance (30%) was observed in the 104 *C. jejuni* isolates with MICs ranging from 32 to >256 µg/ml. These data concur with similar ranges of MICs reported from a number of countries around the world.
- Several studies showed that plasmids are associated with virulence of *C. jejuni* in vitro: mutational study of the 37 kb plasmid pVir showed enhancement of *in vitro* invasiveness of the mutant (Bacon et al., Echeby et al.). However, the role of plasmids in external virulence of *C. jejuni* has not been assessed *in vivo*.
- pVir and *tetO* were detected in 3 (2.9%) and 39 (37.5%) isolates, respectively, from plasmids of 104 *C. jejuni* isolates. These data indicate that pVir plasmid and *tetO* gene, previously reported in *C. jejuni* strains throughout the world, is also present in Korean isolates.
- This study led us to understand the role of these plasmids in the pathogenesis and antibiotic resistance of *C. jejuni* in Korea.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the Korean Research Foundation Grant (KRF-2005-000070).

REFERENCES

- Bacon WE, et al. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(10): 2933-2937
- Bacon WE, et al. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(4): 1163-1174
- Bacon D J, et al. *Infect Immun* 2002; 70: 6242-6250
- Walker T W, et al. *Microbiol* 1997; 149: 5-7

Association of antimicrobial resistance and PFGE genotypes of thermophilic *Campylobacter* spp. isolated from cattle farms in WA and CA

Wonki Bae^{1,2}, Dale D. Hancock², Douglas R. Call², Yong Ho Park¹, Thomas E. Besser²

¹College of Vet. Med., Seoul National University, Seoul, Korea, ²College of Vet. Med., Washington State University, Pullman, WA

Introduction

The increasing frequency of Campylobacter infections has been a major public health concern in recent years. The increasing use of antimicrobials in agriculture has been associated with the emergence of antimicrobial-resistant strains. The increasing use of antimicrobials in agriculture has been associated with the emergence of antimicrobial-resistant strains. The increasing use of antimicrobials in agriculture has been associated with the emergence of antimicrobial-resistant strains.

Materials and methods

Study area and sample collection
The study was conducted on cattle farms in Washington State and California. Samples were collected from 2008 to 2010. The study was conducted on cattle farms in Washington State and California. Samples were collected from 2008 to 2010.

Antimicrobial susceptibility testing
Antimicrobial susceptibility testing was performed using a standard protocol. The study was conducted on cattle farms in Washington State and California. Samples were collected from 2008 to 2010.

PFGE genotyping
Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used for genotyping. The study was conducted on cattle farms in Washington State and California. Samples were collected from 2008 to 2010.

Materials and methods, cont.

Statistical analysis
Statistical analysis was performed using a standard protocol. The study was conducted on cattle farms in Washington State and California. Samples were collected from 2008 to 2010.

Strain ID	Location	Year	Antimicrobial Resistance
1	WA	2008	AMR
2	WA	2009	AMR
3	WA	2010	AMR
4	CA	2008	AMR
5	CA	2009	AMR
6	CA	2010	AMR

Table 1. Characteristics of the study strains.

Results



Fig. 1. Dendrogram of the study strains of thermophilic *Campylobacter* spp. (n=11).

The study identified several distinct PFGE patterns. The study was conducted on cattle farms in Washington State and California. Samples were collected from 2008 to 2010.



Fig. 2. Dendrogram of the study strains of thermophilic *Campylobacter* spp. (n=11).

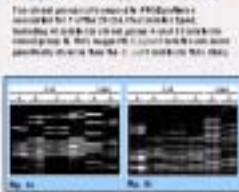


Fig. 3. PFGE typing of the study strains of thermophilic *Campylobacter* spp. (n=11).

Strain ID	Location	Year	Antimicrobial Resistance
1	WA	2008	AMR
2	WA	2009	AMR
3	WA	2010	AMR
4	CA	2008	AMR
5	CA	2009	AMR
6	CA	2010	AMR

Table 2. Characteristics of the study strains.

The study identified several distinct PFGE patterns. The study was conducted on cattle farms in Washington State and California. Samples were collected from 2008 to 2010.

Conclusions

The study identified several distinct PFGE patterns. The study was conducted on cattle farms in Washington State and California. Samples were collected from 2008 to 2010.

Strain ID	Location	Year	Antimicrobial Resistance
1	WA	2008	AMR
2	WA	2009	AMR
3	WA	2010	AMR
4	CA	2008	AMR
5	CA	2009	AMR
6	CA	2010	AMR

Table 3. Characteristics of the study strains.

The study identified several distinct PFGE patterns. The study was conducted on cattle farms in Washington State and California. Samples were collected from 2008 to 2010.

Conclusions

The study identified several distinct PFGE patterns. The study was conducted on cattle farms in Washington State and California. Samples were collected from 2008 to 2010.

Literature cited

1. Besser TE, Hancock DD, Call DR, et al. (2011) Association of antimicrobial resistance and PFGE genotypes of thermophilic *Campylobacter* spp. isolated from cattle farms in WA and CA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 1234-1240.
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...

Acknowledgments

The authors thank the funding agencies for their support. The study was conducted on cattle farms in Washington State and California. Samples were collected from 2008 to 2010.

Detection of erythromycin resistance using by Single nucleotide polymorphisms in *Campylobacter* spp

Joon Bae Hong^{1,2}, Jun Man Kim², Won Ki Bae², Woo Kyung Jung², Hye Cheong Koo², So Hyun Kim², Jeong Hee Ser², Yong Ho Park²

Hazard analysis team, Consumer safety Center, Korea Consumer Protection Board¹, Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University²

ABSTRACT

Campylobacter species are one of the most common causes of bacterial diarrhea in humans worldwide. Two *Campylobacter* species are usually associated with most of the infections in man: *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Macrolides, the drugs of choice for treating *Campylobacter* infections, are widely used in the veterinary field for prophylactic and therapeutic purposes. Massive consumption of these drugs may lead to the emergence of macrolide-resistant isolates, resulting in problems in the treatment of resistant *Campylobacter* infection. Macrolides such as erythromycin act by binding to the 50S subunits of bacterial ribosomes and interfere with protein synthesis by inhibiting the elongation of peptide chains. The main mechanism of macrolide resistance was due to a single point mutation 23S rRNA gene. The most predominant mutation identified among the *C. coli* and *C. jejuni* isolates were the A-2230-G transition mutation. Single nucleotide polymorphism was the use of 5'-fluorescence-labeled oligonucleotides that were blocked at their 3' ends, thereby preventing elongation by DNA polymerase. Besides the special oligonucleotide, PCR has two traditional oligonucleotides which function as primers and are chosen in regions flanking the special oligonucleotide. The special oligonucleotide hybridizes with the target and is removed by the 5'-3' exonuclease activity of Taq DNA polymerase during primer extension, resulting in enhanced fluorescence that can easily be detected. In this study, we investigated the detection of macrolide resistance using by single nucleotide polymorphisms.

Materials and Methods

1. Origin of *Campylobacter* isolates

Fourteen from animal products ; Six from human hospitals

2. Antimicrobial resistance tests

Antimicrobial resistance was performed with disc diffusion test against Erythromycin (ERY) and minimum inhibitory concentration (MIC) of methicillin was determined with microdilution test based on NCCLS method.

3. Sequencing for 23 rRNA gene

The genes were amplified by using PCR as described in published reports. PCR amplicons were purified by using Microspin/MiniRan, Korea) columns in accordance with the manufacturer's instructions.

Sequencing of both strands of the amplified fragments was achieved by using an Applied Biosystems Prism 377 automated sequencer with dRhodamine-labeled terminators (PE Applied Biosystems, USA.)

4. SNP using by Real time PCR

We designed a TaqMan-minor groove binding (MGB) allelic discrimination assay around the nonsense mutation. The TaqMan-MGB probes were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA). One probe was designed to specifically hybridize to the *Campylobacter* 23S rRNA sequence (5'-VIC-AAGA-CGGAAAGACC-3'-MGB), and the other was designed to hybridize to the alternate allele (5'-EAM-CAAGAC-GGAGAGACC-3'-MGB). Realtime PCRs were conducted in 100- μ l reaction mixtures that contained 600 nM of both forward (5'-

Results and Discussion

Isolates	Origin	ERY	MIC (mg/ml)	Isolates	Origin	ERY	MIC (mg/ml)
C. coli 1	Chicken	S	8	C. jejuni 23	Chicken	R	16
C. coli 2	Chicken	S	2	C. jejuni 26	Chicken	R	16
C. coli 3	Chicken	R	16	C. jejuni 28	Chicken	S	8
C. coli 4	Chicken	R	16	C. jejuni 29	Chicken	R	16
C. coli 25	Chicken	R	16	C. jejuni 70	Chicken	S	8
C. coli 26	Chicken	S	8	C. jejuni 71	Chicken	S	8
C. coli 31	Chicken	R	16	C. jejuni 80	Chicken	S	8
C. coli 36	Chicken	R	16	C. jejuni 87	Human	S	8
C. jejuni 1	Chicken	S	8	C. jejuni 770	Human	S	2
C. jejuni 2	Chicken	R	16	C. jejuni 748	Human	S	8
C. jejuni 8	Chicken	R	16	C. jejuni 742	Human	S	2

FIG. 1. Origin of 20 isolates, resistance to Erythromycin (ERY) in *Campylobacter* spp.

1. Erythromycin resistance tests and sequencing for 23 rRNA gene

Fourteen isolates were animal origin, and 4 isolates were human origin. Resistance to erythromycin were 10 isolates in this study. Ten of the 20 isolates for which the erythromycin MIC was 256-512 μ g/ml had an A-2230-G mutation encoded in the 23S rRNA.

Isolates	WT (WT)	A-2230-G
C. coli 1	S	DEGADAGG AAGAGCCG TGG TGGACCTG TAGACTCTG
C. coli 3	R	DEGADAGG AAGAGCCG TGG TGGACCTG TAGACTCTG
C. jejuni 1	S	DEGADAGG AAGAGCCG TGG TGGACCTG TAGACTCTG
C. jejuni 8	R	DEGADAGG AAGAGCCG TGG TGGACCTG TAGACTCTG
C. jejuni 24	S	DEGADAGG AAGAGCCG TGG TGGACCTG TAGACTCTG

2. Single Nucleotide polymorphisms by using Real time PCR

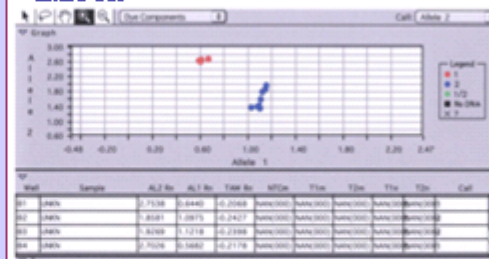


FIG. 2. Allelic distribution plot of *Campylobacter* 23S rRNA gene from animal and human origin. *Campylobacter* were amplified by using the TaqMan real-time PCR, were plotted by using the allelic discrimination assay of real-time PCR. The plot represents allele 1 (A-2230-G) as a blue point, represents allele 2 (A-2230-G).

CONCLUSION

We report that the use of SNP allelic discrimination assay is suitable for the rapid detection of SNPs to detect and estimate the number of 23S rRNA genes containing A-2230-G mutations in 20 *Campylobacter* isolates from human and animal origin. In conclusion, SNPs allelic discrimination provided extremely rapid alternative antibiotic resistance mechanism and its application to other medical microbiological purposes deserves investigation.

제 6 장 참고문헌

1. Allan hogue, Reginald Johnson, and Wayne Schlosser : *Salmonella typhimurium* DT104, Situation Assessment, Food Safety and Infpection Service, 1997.
2. Ann M. Roering, John B. Luchansky, Anne M. Ihnot, Susan E. Ansay, Charles W. Kaspar, Steven C. Ingham : Comparative survival of *Salmonella typhimurium* DT104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid, Int. J. Food Microbiol., 46:263-269, 1999.
3. Anne M. Ihnot, Ann M. Roering, Rachel K. Wierzba, Nancy G. Faith, and John B. Luchansky : Behavior of *Salmonella typhimurium* DT104 during the manufacture and storage of pepperoni, Int. J. Food Microbiol., 40:117-121, 1998.
4. Baay, M. F. D. and J. H. J. Huis : Alternative antigens reduce cross-reactions in an ELISA for the detection of *Salmonella enteritidis* in poultry, 74:243-247, 1993.
5. Barrow, P. and others : Detection of *Salmonella* infection by ELISA, The veterinary record, short communications, december 2, p586, 1989.
6. Barry H. Pyle, Susan C. Broadaway, and Gordon A. McFeters : A rapid, direct method for enumerating respiring Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water, Appl. Environ. Microbiol., 61:2614-2619, 1995.
7. Carlson, S. A., L. F. Bolton, C. E. Briggs, H. S. Hurd, V. K. Sharma, P. J. Fedorka-Cray, and B. D. Jones : Detection of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104

using multiplex and fluorogenic PCR, *Molecular and Cellular Probes*, 13:213-222, 1999.

8. Casin I., Breuil J., Brisabois A., Moury F., Grimont F., and Collatz E : Multidrug-resistant human and animal *Salmonella typhimurium* isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and integron-encoded beta-lactamase PSE-1, *J. Infect. Dis.*, 179(5):1173-1182, 1999.

9. Chao-Ming Tsai and Carl E. Frasch : A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide Gels, *Analytical Biochemistry*, 119:115-119, 1982.

10. Christian huet : Production of Polyclonal Antibodies in Rabbits, *Cell biology, a laboratory handbook*, 2nd ed., vol. 2, 1998.

11. Christina A. Cherrington and J. H. J. Huis : Development of a 24h screen to detect viable salmonellas in feces, *J. Appl. Bacteriol.*, 75:58-64, 1993.

12. Choi, D., R. S. W. Tsang, and M. H. Ng : Sandwich capture ELISA by a murine monoclonal antibody against a genus-specific LPS epitope for the detection of different common serotypes of salmonellas, *J. Appl. Bacteriol.*, 72:134-138, 1992.

13. Dagmar Jurgens and Franz-J. Fehrenbach : Identification of *Legionella* species by lipopolysaccharide antigen pattern, *J. Clinical Microbiol.*, 35(12)3054-3057, 1997.

14. Edwards and Ewing : Identification of enterobacteriaceae, Elsevier, 4th ed., chapter 9, 10, 11, 1986.

15. Evans S. J., A case control study of multiple resistant *Salmonella typhimurium* DT104 infection of cattle in Great Britain, Cattle Practice, British Cattle Veterinary Association. 4, no. part3, 1997.
16. Fred G. van Zijderveld, Ank M. van Zijderveld-van Bommel, and Julius Anakotta : Comparison of four different Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in experimentally infected chickens, J. Clinical Microbiol., 30:2560-2566, 1992.
17. Gonzalez I, Grant , Ricahrdson, Park et al, Specific Identification of the Enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using a PCR Test Based on the *ceuE* Gene Encoding a Putative Virulence Determinant, 35 : 759-763, 1997
18. Gosek G., Leschinsky D, and Irons S : Multidrug-resistant *Salmonella* serotype United States, MMWR, 46:308-310, 1996.
19. Hassan, J. O., P. A. Barrow, A. P. A. Mockett, S. Mcleod : Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA, Vet. Rec., 126:519-522, 1990.
20. Hideaki Yokoyama, Kouji Umeda, Robert C. Peralta, Tomomi Hashi, Faustino C. Icatlo Jr, Masahiko Kuroki, Yutaka Ikemori and Yoshikatsu Kodama : Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium*, Vaccine, 16(4):388-393, 1998.

21. Hoorfar, J. and V. Bitsch : Evaluation of an O-antigen ELISA for screening cattle herds for *Salmonella typhimurium*, *Veterinary Rec.*, 137:374-379, 1995.
22. Jerry Liao, Katherine G. Nickerson, Slavomir Bystricky, John B. Robbins, Rachel Schneerson, Shousun C. Szu, and Elvin A. Kabat : Characterization of a human monoclonal immunoglobulin M(IgM) antibody(IgM^{BEN}) specific for Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*, *Infection and Immunity*, 63(11):4429-4432, 1995.
23. John M. Luk, Urirat Kongmuang, Raymond S. W. Tsang, and Alf A. Lindberg : An Enzyme-Linked Immunosorbent assay to detect PCR products of the *rfbS* gene from serogroup D Salmonellae: a rapid screening prototype, *J. Clinical Microbiol.*, 35(3):714-718, 1997.
24. Johonson, K. G. and M.B. Perry : Improved techniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharides, *Can. J. Microbiol.*, 22:29-34, 1975.
25. Jung, Y. S. and L.R. Beuchat : Survival of mutidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in egg powders as affected by water activity and temperature, *Int. J. Food Microbiol.*, 49:1-8, 1999.
26. Jurgen H. Krauss, Jurgen Weckesser, and Hubert Mayer : Electrophoretic analysis of lipopolysaccharides of purple nonsulfur bacteria, *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 38(2):157-163, 1988.
27. Karen L. Dodds, Malcolm B. Perry and Ian J. Mcdonald : Electrophoretic and immunochemical study of the Lipopolysaccharides produced by chemostat-grown

Escherichia coli O157, J. General Microbiol., 133:2679-2687, 1987.

28. Kerr, S., H. J. Ball, D. P. Mackie, D. A. Pollock, and D. A. Finlay : Diagnostic application of monoclonal antibodies to outer membrane protein for rapid detection of *Salmonella*, J. Appl. Bacteriol., 72:302-308, 1992.

29. Kim, Mi Sun and Michael P. Doyle : Dipstick immunoassay to detect Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Retail Ground Beef, Appl. Environ. Microbiol., 58(5):1764-1767, 1992.

30. Kirsten Niebuhr, Andreas Lingnau, Ronald Frank, and Jurgen Wehland : Rapid procedures for preparing monoclonal antibodies and identifying their epitopes, Cell biology, a laboratory handbook, 2nd ed., vol. 2, 1998.

31. Lee, Won-Chang, Takeo Sakai, Myeong-Jin Lee, Masaaki Hamakawa, Song-Mong Lee, and In-Mo Lee : An epidemiological study of food poisoning in Korea and Japan, Int. J. Food Microbiol., 29:141-148, 1996.

32. Myan N., Widjoatmodjo, Ad C. Fluit, Ruurd Torensma, Geert P. H. T. Verdonk, and Jan Verhoef : The Magnetic Immuno Polymerase Chain Reaction Assay for direct detection of *Salmonellae* in fecal samples, J. Clinical Microbiol., 30(12):3195-3199, 1992.

33. NG, S. P., C. O. Tsui, D. Roberts, P. Y. Chau, and M. H. NG : Detection and serogroup differentiation of *Salmonella* spp. in food within 30 hours by enrichment-immunoassay with a T6 Monoclonal Antibody capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Appl. Environ. Microbiol., 62(7):2294-2302, 1996.

34. Nogva HK, Bergh A, Holck A, Application of the 5'-Nuclease PCR Assay in Evaluation and Development of Methods for Quantitative Detection of *Campylobacter jejuni*. 66:4029-4036, 2002.
35. Penny J. Hitchcock and Teresa M. Brown : Morphological Heterogenicity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels, J. Bacteriology, 154:269-277, 1983.
36. Perry, B. M., David R. Bundle, Margarret A. J. Gidney, and Hermony Lior : Identification of *Escherichia coli* Serotype O157 strains by using a monoclonal antibody, J. Clinical Microbiol., 26(11):2391-2394, 1988.
37. Poppelier, J. G., Rob van Beurden, Ad C. Fluit, and Jan Verhoef : Monoclonal antibodies that detect live Salmonellae. App. Environ. Microbiol., 58:3868-3872, 1992.
38. Ralph B. Westerman, Yongsheng HE, James E. Keen, E. Travis Littledikey, and Jimmy Kwang : Production and characterization of monoclonal antibodies specific for the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157, J. Clinical Microbiol., 35(3):679-684, 1997.
39. Robin L. Brigmon, Stephen G. Zam, and Henry R. Wilson : Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs and chicken with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Poultry Sci., 74:1232-1236, 1995.
40. Roger P. Johonson, Rebecca J. Durham, Shelley T. Johonson, Leslie A. Macdonald, Scott R. Jeffrey, and Bryan T. Butman : Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat

by an enzyme linked immunosorbent assay, EHEC-Teck, Appl. Environ. Microbiol., 61: 386-388, 1995.

41. Shapira, R., N. Paster, M. Menasherov, O. Eyal, A. Mett, T. Meiron, E. Kuttin, and R. Salomon : Development of polyclonal antibodies for detection of aflatoxigenic molds involving culture filtrate and chimeric proteins expressed in *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol., 63(3):990-995, 1997.

42. Slauch, M. James, Michael J. Mahan, Pierre Michetti, Marian R. Neutra, and John J. Mekalanos : Acetylation(O-Factor 5) affects the structural and immunological properties of *Salmonella typhimurium* lipopoly- saccharide O antigen, Infection and Immunity, 63:473-441, 1995.

43. Suarez, AM, JM Rodriguez, PE Hernandez, and Azcona-Olivera : Generation of polyclonal antibodies against nisin: immunization strategies and immunoassay development, Appl. Environ. Microbiol. 62:2117-2121, 1996.

44. Timoney, J. F., N. Sikora, H. L. Shivaprasad, and M. Opitz : Detection of antibody to *Salmonella enteritidis* by a gm flagellin-based ELISA, Vet. Rec., 127:168-169, 1990.

45. Vries, N. D., K. A. Zwaagstra, J. H. J. Huis IN'T Veld, F. VAN Knapen, F. G. VAN Zijderveld, and J. G. Kusters : Production of monoclonal antibodies specific for the i and 1,2 flagella antigens of *Salmonella typhimurium* and characterization of their respective epitopes, Appl. Environ. Microbiol., 64(12):5033-5038, 1998.

46. Wanpen Chaicumpa, Yuwaporn Ruangkunaporn, Donald Burr, Manas

Chongsa-Nguan, and Peter Echeverria : Diagnosis of typhoid fever by detection of *Salmonella typhi* antigen in urine, J. clinical Microbiol., 30(9):2513-2515, 1992.

47. Weintraub, A., B. N. Johnson, B. A. D. Stocker, and A. A. Lindberg : Structural and immunochemical studies of the lipopolysaccharides of *Salmonella* strains with both antigen O4 and antigen O9, J. Bacteriol., 174(6):1916-1922, 1992.

48. Wenbin Xu and Didier Raoult : Production of Monoclonal antibodies against *Rickettsia massiliae* and their use in antigenic and epidemiological studies, J. Clinical Microbiol., 35(7):1715-1721, 1997.

49. Wyatt G. M., M. N. Langley, H. A. Lee, and M. R. A. Morgan : Further studies on the feasibility of one-day *Salmonella* detection by Enzyme-Linked Immunosorbent assay, Appl. Environ. Microbiol., 59(5):1383-1390, 1993.

50. Yongsheng HE, James E. Keen, Ralph B. Westerman, E. Travis Littledike, and Jimmy Kwang : Monoclonal antibodies for detection of the H7 antigen of *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol., 62(9):3325-3332, 1996.

51. Ziad W. Jaradat and Jerzy Zawistowski : Production and characterization of monoclonal antibodies against the O-5 antigen of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide, Appl. Environ. Microbiol., 62(1):1-5, 1996.

52. Foodborne Diseases Active Surveillance Network, United States, CDC, MMWR, Vol. 50, No. 13, p241-246

53. 일본 후생성, 2001년도 일본에서의 식중독 세균 발생 현황, 2002

54. 식품의약품 안전청, 2001년도 식중독 세균 발생 현황, 2002

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.